Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel

Die Rolle der Oxalsäure in der Pflanze.

Enzymatischer Abbau des Oxalat-Ions.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät

der

Universität Basel

vorgelegt von

Markus Staehelin

aus Basel.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Berlin 1919.

Genehmigt von der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung der Philosophischen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. G. Senn und Dr. H. Rupe.

Basel, den 17. Dezember 1918.

Prof. Dr. A. L. Bernoulli
Dekan.

Sonderabzug
aus der Biochemischen Zeitschrift, Bd. 96, Heft 1, 1919.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Einleitung.

Die organischen Säuren, die im Stoffwechsel der Succulenten eine bedeutende Rolle spielen, sind schon oft Gegenstand der Untersuchung gewesen. Beim Studium der dabei entstandenen Literatur erkennt man aber, daß trotz zahlreicher Arbeiten noch nicht alle Fragen gelöst sind, welche die eigenartige Erscheinung erklären, daß die Fettpflanzen am Morgen eine stark saure Reaktion zeigen, die während des Tages fast vollständig verschwindet, um während der Nacht von neuem wiederzukehren. Dieser Vorgang ist zwar ökologisch, als Anpassung der Succulenten an xerophytische Lebensweise, wohl verständlich. Diese Pflanzen sind durch die klimatischen Bedingungen, unter denen sie gedeihen, gezwungen, mit dem Wasservorrat äußerst haushälterisch umzugehen und deshalb Transpiration und Gaswechsel stark einzuschränken. Diese Erschwerung des Gasaustausches wird als Grund für die Entstehung organischer Säuren angesehen. Eine befriedigende physiologische Erklärung dieser für die Succulenten charakteristischen Erscheinung steht aber noch aus.

Der auch bei einigen Nichtsucculenten vorkommende Säurewechsel wurde noch viel weniger studiert und es konnte für ihn bisher nicht einmal eine ökologische Erklärung gefunden werden. Die von den verschiedenen Forschern über den Säurewechsel der Phanerogamen aufgestellten Hypothesen

hat K. Bassalik (1917) zusammengestellt. Da aber seine Ausführungen sehr kurz gefaßt sind, lasse ich einen historischen Überblick über die Entwicklung der Frage folgen.

Ad. Mayer (1875 und 1878) betrachtet die organischen Säuren, speziell die Isoäpfelsäure der Crassulaceen, als Produkte der Atmung, die durch die Einwirkung des Lichts unter stufenweiser Reduktion in Kohlenhydrate übergeführt werden.

Kraus (1886a) hält die Säureperiodizität bei Succulenten und Nichtsucculenten für eine allgemeine Erscheinung im Pflanzenreich, die aber bei den meisten Pflanzen wenig deutlich zutage tritt. Bei den Crassulaceen, bei denen diese periodische Säure-Zunahme und -Abnahme besonders deutlich ausgebildet ist, verfolgt Kraus (1886b) den Prozeß quantitativ. Die in der Nacht gebildete Säure ist nach diesem Autor als intermediäres Produkt der Atmung aufzufassen; wegen Sauerstoffmangel wird sie nicht weiter oxydiert. Die Säureabnahme am Tag ist einesteils durch das Licht bedingt, da die Säure photochemisch zerfällt, anderenteils aber wird diese durch den bei der Assimilation freiwerdenden Sauerstoff weiter oxydiert.

Eine etwas andere Auffassung des Säurewechsels vertritt de Vries (1885), nach dessen Untersuchungen die organischen Säuren sowohl am Tag wie auch in der Nacht als Produkte der Atmung gebildet, jedoch stets weiter oxydiert werden. Die Intensität der Oxydation ist vor allem bedingt durch Temperaturerhöhung; es ist aber nicht ausgeschlossen, daß das Licht einen Zerfall der Säure bewirkt. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die Nichtsucculenten.

Der Ansicht von Kraus schloß sich Warburg (1886) an. Er sieht in den organischen Säuren Produkte unvollständiger Verbrennung. Der Entsäuerungsprozeß hängt von Licht und Sauerstoff ab, ist jedoch nicht rein chemischer, sondern auch physiologischer Natur und steht mit dem Leben der Pflanze in enger Beziehung. Er fand auch (S. 112), daß die Fettpflanzen nicht nur die in ihren Zellen gebildete, sondern auch die von außen gebotene Säure verarbeiten.

Gerber (1896) verfolgt den Reifeprozeß der Früchte; bei diesem schwinden die Säuren bis auf ein Minimum, während parallel dazu eine Vermehrung des Zuckers erfolgt. Wie Mayer nimmt auch Gerber eine stufenweise Reduktion der organischen Säuren zu Kohlenhydraten an. Die Abnahme der Säure wird durch Sauerstoff, wie auch durch erhöhte Temperatur stark gefördert.

Nach Spoehr (1913) ist der Entsäuerungsprozeß der Succulenten nicht an den Lebensprozeß der Pflanze gebunden, sondern stellt einen rein photochemischen Prozeß dar, indem die organischen Säuren im Licht zerfallen.

Auch bei niederen Pflanzenorganismen wurde die Bildung der Oxalsäure studiert. Nach Wehmer (1891) ist die Oxalsäurebildung bei Aspergillus und Penicillium ein regulatorischer Prozeß, in-

dem bei der Veratmung der Glucose die Oxalsäure als intermediäres Produkt gebildet und, wenn nicht als unlösliches Salz abgelagert, sofort im Stoffwechsel weiterverarbeitet wird.

Bei den höheren Pflanzen untersuchte Benecke (1903) die Bedingungen, die zur Ablagerung des Oxalats führen. Es gelang ihm, beim Mais die Calciumoxalatablagerung zu vermehren, wenn er ihm Nitrat als Stickstoffnahrung bot; wird ihm aber Ammoniak als Stickstoffquelle dargereicht, so findet keine Oxalatablagerung statt.

Bei den Caryophyllaceen ist es Amar (1903) gelungen, in kalkfreien Medien oxalatfreie Pflanzen zu erhalten. Die Ablagerung des Oxalats ist auch hier ein regulatorischer Prozeß.

An die Ausführungen von Wehmer kann die Arbeit von Bassalik (1913) angeschlossen werden. Er isolierte den Bacillus extorquens, der die Fähigkeit besitzt, die Oxalsäure wie auch ihre Salze alz einzige Kohlenstoffquelle zu verarbeiten und damit seine Leibessubstanz aufzubauen. Von größerer Tragweite war die Tatsache, daß die Verarbeitung der Oxalsäure nicht nur durch den Bacillus selbst ausgeführt wurde, sondern auch durch ein von ihm produziertes Ektoenzym. Dieser Prozeß wurde darum von diesem Autor (S. 285) als ein enzymatischer aufgefaßt. Dieses Resultat mußte die Frage nahelegen, ob auch bei den grünen Pflanzen, in denen die Oxalsäure wie auch ihre Salze gefunden werden, ein Enzym vorhanden ist, das die Fähigkeit besitzt, die Oxalsäure und ihre Salze wieder in den Stoffwechsel der Pflanzen zu ziehen.

Die erste Mitteilung von einer enzymatischen Oxydation der Oxalsäure geht auf Zaleski und Reinhard (1911) zurück. Tränkten sie Weizenmehl mit Oxalsäure, so fanden sie eine größere Kohlendioxydausscheidung als bei der Durchtränkung des Mehles mit Wasser. Dabei war für die Verarbeitung Sauerstoff nötig; denn in einer Wasserstoffatmosphäre fanden sie keine Verarbeitung der Oxalsäure. Zur Charakterisierung dieses Prozesses als eines enzymatischen Vorganges setzten die beiden Forscher zu dem verwendeten Mehl Aceton und Äther zu, wobei die Oxydation der Oxalsäure ebensogut verlief wie bei dem nicht abgetöteten Weizenmehl. Daraus zogen sie den Schluß, im Weizenmehl müsse ein Enzym oder ein Katalysator vorhanden sein, der die Verarbeitung bewirke. Leider haben sie bei ihren Untersuchungen nur die Menge des ausgeschiedenen Kohlendioxyds, nicht aber, was wesentlich gewesen wäre, die Abnahme der Oxalsäure bestimmt. Den exakten Beweis dafür, daß im Weizen ein Enzym vorhanden sei, das die Oxalsäure verarbeitet, sind sie uns darum schuldig geblieben.

Bassalik (1917) wies dagegen nach, daß die Verarbeitung des Oxalations bei säurehaltigen Nichtsucculenten, insbesondere bei Rumex acetosa, auf enzymatische Weise erfolge.

Während wir bis vor kurzem über die Entstehung und besonders über die Abnahme der organischen Säuren uns nur ein recht dürftiges Bild machen konnten, eröffnete sich uns

durch die Arbeiten von Bassalik, Zaleski und Reinhard, die bei Bacillus extorquens, Rumex acetosa und Weizenmehl ein Oxalsäure verarbeitendes Enzym nachgewiesen haben, eine weite Perspektive.

Von den zahlreichen Fragen, die sich dabei erheben, suchte ich folgende zu beantworten:

1. Kommt ein die Oxalsäure verarbeitendes Enzym nur bei den genannten Pflanzen vor, oder hat es im Pflanzenreich eine allgemeine Verbreitung, so daß außer den von Bassalik untersuchten Pflanzen (Rumex, Begonia und Oxalis) noch andere Nichtsucculenten das von außen gebotene Oxalat verarbeiten?

2. Findet eine enzymatische Verarbeitung der Oxalsäure auch bei säurefreien Pflanzen statt?

3. Sind hierzu nur die Blätter befähigt, oder kann dieser Prozeß von allen Zellen der Pflanze durchgeführt werden?

4. Worin besteht die Kinetik des Prozesses?

Es wäre nun denkbar, daß säurefreie Pflanzen das in ihnen enthaltene Ca-Oxalat wegen seiner Unlöslichkeit nicht zu verarbeiten vermöchten, wohl aber imstande wären, die im Zellsaft löslichen Oxalatverbindungen abzubauen. In vorliegender Arbeit habe ich die Fähigkeit zur Verarbeitung des Ca-Oxalats nicht untersucht, sondern mich darauf beschränkt, zunächst einmal festzustellen, ob säurefreie Pflanzen überhaupt imstande seien, das ihnen in der zugänglichsten Form, also gelöst gebotene Oxalation zu verarbeiten.

Vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Dr. K. Bassalik, Assistent am Botanischen Institut der Universität Basel, in der Zeit vom Sommersemester 1917 bis Sommersemester 1918 ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, ihm an dieser Stelle für seine wertvollen Ratschläge und stete Hilfsbereitschaft den herzlichsten Dank auszusprechen. Ebenso danke ich Herrn Prof. G. Senn, der mir bei der Abfassung der Arbeit mit Rat und Tat beistand.

Experimenteller Teil.

I. Methodik.

Die gestellten Fragen können nur dann einer befriedigenden Beantwortung zugeführt werden, wenn die analytische Methodik einwandfrei ist. Für meine Fragestellung kam eine acidimetrische Bestimmung der Säure nicht in Betracht, da die mit dieser Methode feststellbaren Aciditätsänderungen über die Änderung der Menge des Oxalations gar nichts aussagen.

Eine Kritik der Aciditätsbestimmung durch Titration ist deshalb notwendig, weil Steinmann (1917) in Anlehnung an viele frühere Forscher[1]) diese Methode bei seinen Untersuchungen über den Säurewechsel von Rhabarber angewendet hat. Sie leidet an dem prinzipiellen Fehler, daß durch die Titration nur die freien Wasserstoffionen der Pflanzensäuren bestimmt werden. Sind die organischen Säuren als freie Säuren oder als saure Salze im Zellsaft gelöst, so wäre deren titrimetrische Bestimmung unter Berücksichtigung der anderen Fehlerquellen möglich; sind aber die Säuren in der Zelle als neutrale Salze enthalten, so sind sie titrimetrisch überhaupt unfaßbar. Solche titrimetrische Untersuchungen von Pflanzensäften bieten jedoch wegen der Anwesenheit von gefärbten Stoffen (Gerbstoffe, Glucoside, Flavone, Chromotaphorenfarbstoffe und Anthocyane) große Schwierigkeiten bei der Feststellung eines scharfen Farbenumschlags. Darum sind die Resultate der Aciditätsbestimmungen früherer Forscher so reich an Widersprüchen. Eine kritische Zusammenstellung dieser Abweichungen findet sich in der Arbeit von K. Bassalik (1917).

Wenn man aber auch mit Hilfe der Titrationsmethode scharfe Farbenumschläge erhielte und alle Ionen der Säuren im Zellsaft frei zugegen wären, so müßte bei titrimetrischen Untersuchungen noch die Tatsache berücksichtigt werden, daß die Pflanzensäfte ein heterogenes Gemisch der verschiedensten Stoffe darstellen. Man wird nicht fehlgehen, wenn man in den

---

[1]) Kraus (1886a), Lange (1886), de Vries (1885), Warburg (1886).

Extraktionssäften, die zur Titration verwendet werden, eine große Menge kolloider Körper annimmt. Diese Körper bilden zweifellos eine starke Fehlerquelle. Die Kolloide sind dadurch charakterisiert, daß sie eine enorme Oberflächenentwicklung und damit verbunden eine starke Adsorptionsfähigkeit besitzen. Durch diese Eigenschaften werden sie eine bestimmte Menge der zugesetzten Lauge an ihren Oberflächen festhalten, und diese geht für die weitere Neutralisation der Säure verloren. Die Pflanzensäfte enthalten auch Eiweißkörper und deren Abbauprodukte. Wären diese neutrale Körper, so würden sie die Titration nicht stören. Da aber die Proteine, sowohl wie auch ihre Spaltprodukte, vor allem die Aminosäuren, amphotere Verbindungen sind (sie besitzen basische Eigenschaften wegen ihrer Aminogruppen und sauren Charakter wegen ihrer Carboxylgruppen), binden sie ebenfalls eine bestimmte Hydroxylmenge.

So zeigt die Kritik, daß wir durch Aciditätsbestimmungen keine Auskunft erhalten über die Zu- und Abnahme des Säureanions bzw. des Oxalations bei den Rumexarten oder des Malations bei den Crassulaceen. Die bei den Crassulaceen in der Nacht stattfindende Aciditätszunahme beweist noch lange nicht eine Zunahme des Malations, sondern nur eine Zunahme der freien Wasserstoffionen, die von verschiedenen Stoffen herstammen können, und eine Abnahme der Acidität am Tage sagt nichts Bestimmtes aus über eine Abnahme des Säureanions, sondern nur, daß sich die Menge der Wasserstoffionen verringert hat.

Bei meinen Versuchen war also die Titrationsmethode von vornherein ausgeschlossen. Um befriedigende Resultate zu erhalten, mußte ich die Abnahme des Oxalations selbst quantitativ feststellen.

a) Analyse.

Der Analysengang war kurz folgender:

Nach Abbruch des Versuchs versetzen des Blattpulvers mit konzentrierter Essigsäure und sofortiges Aufkochen. Filtrieren durch Chamberlandkerzen (im Vakuum). Das völlig klare Filtrat wird mit Ammoniak versetzt bis zum Eintritt alkalischer Reaktion, die sich durch eine gelbe bis braune Färbung erkennbar macht. Aufkochen und 24 Stunden stehen lassen. Abfiltrieren des gefällten Niederschlags durch Chamberlandkerzen.

Versetzen des Filtrats mit konzentrierter Essigsäure bis zur sauren Reaktion, Aufkochen und abermals 24stündiges Stehenlassen. Filtrieren durch Chamberlandkerzen; Filtrat erwärmen und mit Calciumacetat in der Hitze versetzen; 24stündiges Absitzenlassen. Das evtl. ausgefallene weiße Calciumoxalatpulver kalt durch Chamberlandkerzen abfiltrieren; zuerst mit ammoniakhaltigem heißem, darauf mehrmals mit kaltem destilliertem Wasser spülen und schließlich in 2 norm. heißer Schwefelsäure lösen, mit heißem Wasser ausspülen und dieses wasserklare Filtrat gegen $^{n}/_{10}$-Kaliumpermanganatlösung bis zur bleibenden Rosafärbung titrieren. Die Brauchbarkeit und Zuverlässigkeit dieser Methode hat K. Bassalik (1917) festgestellt.

Bei Blattpulvern, deren Calcium nicht an Oxalat gebunden ist und evtl. durch die Essigsäure in Lösung geht, wird durch einen Kontrollversuch der Teil des von außen zugeführten Oxalats bestimmt, der während des Versuchs durch das Calcium des Blattes gebunden wird. Dieser Kontrollversuch wird in folgender Weise durchgeführt.

Zu einer abgewogenen Menge trocknen Pflanzenpulvers wurden 25 ccm destilliertes Wasser und 10 ccm konzentrierte Essigsäure zugesetzt und aufgekocht. Nach dem Erkalten wurden 50 ccm einer bestimmten Ammoniumoxalatlösung zugesetzt, dann der oben skizzierte Analysengang eingeschlagen. Aus der Differenz der zugesetzten und der wiedergefundenen Oxalatmenge ergab sich die Menge Oxalat, die durch das Calcium gebunden wird, welches durch die Essigsäure in Freiheit gesetzt wurde.

Zu 2,0 g Helianthus annuus Blattpulver zugesetzt . . .	0,1527 g C_2O_4''
Es wurde nachher gefunden	0,0290 g C_2O_4''
Durch gelöstes Calcium gebunden	0,1237 g C_2O_4''
Zu 1,0 g Spirogyra spec. wurde zugesetzt	0,2090 g C_2O_4''
Es wurde nachher noch gefunden	0,1115 g C_2O_4''
Durch gelöstes Calcium gebunden	0,0975 g C_2O_4''
Zu 1 g Mesembryanthemum linguae zugesetzt	0,1448 g C_2O_4''
Es wurde nachher noch gefunden	0,1021 g C_2O_4''
Folglich durch lösliches Calcium gebunden .	0,0427 g C_2O_4''

Bei der Untersuchung von Samen mußte der Gang der Analyse abgeändert werden, um die Lösung der Stärke zu verhindern, da die bei ihrer Hydrolyse entstehenden Produkte die Bestimmung des Oxalations unmöglich gemacht hätten.

Zu einer abgewogenen Menge von Weizenmehl wurde eine abgewogene Menge wasserfreies Natriumoxalat gegeben. Dieses Gemisch wurde mit 50 ccm destilliertem Wasser gut vermengt und vor der Analyse mit so viel Alkohol versetzt, bis die Gesamtflüssigkeitsmenge 80 % Alkohol enthielt. Dieser Alkohol verhinderte die Lösung der Stärke und

konnte zugleich Eiweißstoffe fällen. Diese Lösung wurde während 5 Minuten aufgekocht, dann durch Chamberlandkerzen filtriert und mehrmals mit 80% Alkohol gewaschen. Oft war es nötig, das Filtrat ein zweites Mal zu filtrieren, wenn die Flüssigkeit noch Stärke enthielt, was an der Trübung des Filtrates erkannt werden konnte. Das klare Filtrat wurde mit Essigsäure gekocht, um die letzten Reste der Stärke und Eiweißkörper zu hydrolisieren und den Alkohol zu verjagen. Ein evtl. noch entstehender Niederschlag wurde nach 24stündigem Stehenlassen durch Chamberlandkerzen abfiltriert, das Filtrat heiß mit Calciumacetat versetzt und hierauf zur Titration gleich behandelt, wie die aus den Blattpulvern gewonnenen Niederschläge. Dieser Analysengang lieferte zuverlässige Resultate, wie folgende Kontrollversuche beweisen:

Zu 2,0 g Weizenmehl zugesetzt 0,3290 g $Na_2C_2O_4$,
gefunden wurde 0,3288 g = 99,9%.
Zu 2,0 g Weizenmehl zugesetzt 0,4185 g $Na_2C_2O_4$,
gefunden wurde 0,4178 g = 99,8%.
Zu 10,0 g Weizenmehl zugesetzt 0,3403 g $Na_2C_2O_4$,
gefunden wurde 0,3399 g = 99,8%.

b) Darstellung der Enzympräparate.

Aus Bassaliks Untersuchungen geht hervor, daß die Verarbeitung des Oxalations ein enzymatischer Prozeß ist. Zur Darstellung eines wirksamen Enzympräparates aus Blättern Stengeln, Wurzeln und Samen stehen verschiedene Wege offen. Entweder kann die Preßsaftmethode, wie sie Buchner (1903) bei seiner Zymase-Untersuchung verwendet hat, angewandt werden, oder die Gefriermethode von Palladin (1906). Letztere hat Bassalik (1917) mit Erfolg benützt. Für meine Untersuchung war sie nicht geeignet, weil in den meisten Organen der von mir untersuchten Pflanzen die Oxalationen nur in so geringen Mengen vorhanden waren, daß sie schon während der Abkühlung restlos verarbeitet werden konnten.

Die für meine Zwecke praktischere Darstellungsweise geht auf Brown und Morris (1893) zurück, die sie zur Darstellung der Diastase aus verschiedenen Blättern benützten. Die gesammelten Pflanzenteile wurden im Trockenschrank bei einer Temperatur von 40 bis 50° möglichst rasch getrocknet; darauf wurden die getrockneten Pflanzen in einer sterilen Reibschale zu feinem Pulver zerrieben. Diese Präparate wurden gut verschlossen im Dunkeln aufbewahrt und waren noch nach mehreren Monaten wirksam.

Bei der Darstellung von Enzympräparaten ist ein möglichst rasches Töten der Zelle Haupterfordernis, wobei jedoch eine Schädigung des Enzyms vermieden werden muß. Deshalb konnte keine hohe Temperatur angewendet werden, die die Pflanze zwar am raschesten getötet, jedoch die gegen hohe Temperatur sehr empfindlichen Enzyme geschädigt hätte. Um dies zu vermeiden, konnte ich nicht über 40 bis 50° gehen, was eine Trocknungsdauer von 2 bis 24 Stunden nötig machte. Da die Enzyme bei mittleren Temperaturen eine rege Tätigkeit entfalten, hat diese lange Trocknungsdauer den Nachteil, daß sich die verschiedenen Enzyme der Pflanze gegenseitig schädigen konnten. Trotz dieser Nachteile bewährte sich diese Methodik gut.

Um aus dem Samen ein gutes Präparat darzustellen, mußte das Verfahren etwas abgeändert werden. Die Samen wurden zuerst mehrmals gemahlen und dann erst getrocknet. Es hat sich nämlich gezeigt, daß die ungemahlenen Samen zum Trocknen eine bedeutend längere Zeit erfordern als die Blätter. Diese lange Trocknungsdauer, verbunden mit relativ hoher Temperatur, hatte eine schädigende Wirkung auf das Enzym, so daß ich nur minderwertige Präparate erhielt. Dies geht aus folgendem Versuch hervor:

Versuch 1.

Dreitägiger gekeimter Samen von Pisum sativum wurde ungemahlen 6 Wochen auf dem Heizkörper getrocknet; Temperatur 30°.

Zu 5,0 g dieses Präparats (I) wurde zugesetzt . . . . = 0,1642 g C_2O_4''
Nach dem Versuch wurde gefunden . . . . . = 0,1322 g C_2O_4''
Während 24 Std. wurde bei 35° verarbeitet . . . . . = 0,0320 g C_2O_4''
= 19,4 %.

Dreitägiger gekeimter Pisumsamen wurde gemahlen 24 Stunden bei 40° getrocknet.

Zu 5,0 g dieses Präparats (II) wurde zugesetzt . . . . = 0,1590 g C_2O_4''
Nach Abbruch des Versuchs wurde gefunden . . . . = 0,0594 g C_2O_4''
Während 24 Stunden wurde bei 36° verarbeitet . . . = 0,0996 g C_2O_4''
= 62,6 %.

Zu 5,0 g des Präparats (II) wurde nach einer Lagerung während 6 Monaten zugesetzt . . . . . = 0,1874 g C_2O_4''
Nach dem Versuch wurde gefunden . . . . . = 0,0849 g C_2O_4''
Während 24 Stunden wurde bei 35° verarbeitet . . . = 0,1025 g C_2O_4''
= 54,7 %.

Diese Versuche zeigen deutlich den schädigenden Einfluß langen Trocknens, zugleich aber auch, daß das wirksame Enzympräparat (II) nach 6 Monaten des Lagerns wenig von seiner Wirksamkeit eingebüßt hat.

Die Stengel, Wurzeln und die fleischigen Blätter von Mesembryanthemum schnitt ich vor dem Trocknen längs und quer, um die Dauer des Trocknens abzukürzen.

Folgende Versuchsreihe soll zeigen, inwiefern die Art, wie die Blätter getrocknet werden, einen Einfluß auf die Wirksamkeit des Enzyms ausübt. Da es zu viel Zeit gekostet hätte, für jede Pflanze die günstigste Temperatur und Bedingung des Trocknens auszuprobieren, wurden alle Pflanzenteile bei derselben Temperatur getrocknet. Der Einfluß der Trocknungsweise der Pflanzenorgane geht aus folgendem Beispiel hervor:

Ich verwendete Blätter von Rheum officinale (eine kultivierte Art), die zur selben Zeit und vom selben Stock gepflückt und unter den verschiedensten Bedingungen getrocknet wurden.

Versuch 1.

100,0 g Rheumblätter ohne Blattnerven wurden bei 40° im Thermostaten 24 Stunden getrocknet. Die Ausbeute an lufttrocknem Pulver betrug 15,10 g.

Versuch 2.

100,0 g von denselben Blättern wurden im Trockenschrank bei 105° 2 Stunden getrocknet; dann wurden die Blätter, um sie lufttrocken zu machen, für 10 Stunden in die Dunkelkammer gebracht, darauf wurden sie zu Pulver zerstoßen; sie ergaben 15,51 g Pulver.

Versuch 3.

100,0 g Blätter wurden an der Sonne getrocknet. Die Temperatur schwankte zwischen 17 bis 34°; an Lufttrockenpulver erhielt ich 14,4 g.

Versuch 4.

100,0 g Blätter wurden mit einer Fleischhackmaschine zerkleinert; die so erhaltene breiige Masse wurde in dünner Schicht auf eine Glasplatte gestrichen und rasch in einem heißen Luftstrom getrocknet. Die trockne Masse wurde dann pulverisiert. Ausbeute 12,2 g Blattpulver.

Versuch 5.

100,0 g Blätter trockneten im Dunkelzimmer 14 Tage bei einer Temperatur von 18 bis 20°. Die Blätter waren nach dieser Zeit noch nicht völlig lufttrocken; das Pulver wog 21,5 g.

Von den so dargestellten Pulvern wurden je 2,0 g verwendet, um ihre Wirkung in bezug auf die Oxalatverarbeitung zu prüfen. Zu der Blattpulvermenge wurde eine bestimmte Ammoniumoxalatmenge zugesetzt und nach Ablauf des Versuchs das noch unverarbeitete Oxalat bestimmt (siehe auch Versuchsanordnung S. 12).

Dauer des Versuchs 24 Stunden, Temperatur 33°; zum Fernhalten von Mikroorganismen wurde 1 Vol.-% Toluol zugesetzt.

Tabelle I.

Versuch	Vorbehandlung		C_2O_4'' zugesetzt zum Blattpulver	C_2O_4'' gef. nach 24 Std.	C_2O_4''-Abnahme	% d. Abnahme
	Temp.	Dauer	g	g	g	
1	40°	24h	0,2462	0,0915	0,1547	62,8
2	105°	2h	0,2462	0,2035	0,0427	17,3
3	(17—34°)	8h	0,2186	0,1395	0,0791	36,1
4	Heißluft	2h	0,2178	0,1518	0,0660	30,3
5	18—20°	14 Tage	0,2174	0,1166	0,1008	46,4

Die Versuche zeigen, daß die Herstellungsart der Blattpulver auf den Abbau des zugesetzten Oxalations von ausschlaggebender Bedeutung ist. Als günstigste Darstellungsart hat sich, wie Versuch 1 beweist, das 24stündige Trocknen der Blätter bei 40° unter Lichtabschluß erwiesen. Beim 2stündigen Trocknen bei einer Temperatur von 105° erhält man, wie Versuch 2 zeigt, die schwächste Verarbeitung; hier ist das Enzym stark geschädigt, nicht aber völlig abgetötet worden.

Bessere Resultate erzielt man, wie Versuch 5 zeigt, durch das Trocknen der Blätter bei Zimmertemperatur unter Ausschluß von Licht. Hierbei ist eine schädigende Wirkung von Temperatur und von Licht ausgeschlossen, wohl aber infolge der langen Dauer der Trocknung eine ungünstige gegenseitige Wirkung der verschiedenen in den Zellen enthaltenen Enzyme denkbar.

Versuch 4 zeigt, daß auch das bei hoher Temperatur beschleunigte Trocknen eines dünnen auf eine Glasplatte ausgestrichenen Blattbreies das Enzym schädigt.

Außer der hohen Temperatur übt auch das Licht einen schädigenden Einfluß auf das Enzym aus, wie Versuch 3 zeigt. Hier wird es durch die direkten Sonnenstrahlen geschädigt.

c) Versuchsanordnung.

Um Wiederholungen zu vermeiden, soll die Versuchsanordnung hier generell besprochen werden. Wo von ihr abgewichen werden mußte, gebe ich die abweichende Anordnung ausdrücklich an.

Das das Enzym enthaltende Blattpulver wurde in einen 200 ccm fassenden Kolben mit Helmaufsatz gebracht und mit einer bestimmten Menge Oxalatlösung vermengt. Diese wurde mittels einer Bürette oder einer Pipette abgemessen.

Die Kolben wurden während des Versuchs in ein Wasserbad von konstanter Temperatur gestellt. Vor den Versuchskolben schaltete ich eine Vorlage mit 60%iger Kalilauge, um die Kohlensäure der durchgeleiteten Luft zu absorbieren; hinter dem Kolben war eine Pettenkofersche Absorptionsröhre mit einer genau bestimmten Menge titrierter Barytlauge angeschlossen. Diese war mit einem Aspirator in Verbindung, der eine 12stündige Durchsaugung von kohlendioxydfreier Luft gestattete.

Oft war es von Wert, die stündlich durchfließende Luftmenge genau kennen zu lernen; darum wurde noch ein Gasometer in die Versuchsanordnung eingeschaltet. Um Mikroorganismen fernzuhalten, wurde in jeden Versuchskolben 1 bis 2 ccm Toluol zugegeben und nachher der Kolbeninhalt tüchtig durchgeschüttelt.

Zu den ersten Versuchen wurde den Blattpulvern Oxalsäure zugesetzt; doch konnte keine Abnahme des Oxalations konstatiert werden, weil die hohe Konzentration der Wasserstoff-Ionen das Enzym offenbar schädigte oder zerstörte. Viel besser eigneten sich oxalsaure Salze. Als brauchbarstes erwies sich Ammoniumoxalat, bei dessen Verarbeitung Ammoniumcarbonat gebildet wird. Dieses macht wohl das Versuchsmedium alkalisch; jedoch wird das gebildete Ammoniumcarbonat bei erhöhter Temperatur, weil es flüchtig ist, durch den Luftstrom, der den Versuchskolben passiert, weggeführt, so daß keine bedeutende schädigende Wirkung durch die Änderung der Wasserstoffionen-Konzentration zu fürchten ist. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde den Versuchskolben 10 ccm konz. Essigsäure zugesetzt und die Flüssigkeit quantitativ in einen Erlenmeyer-Kolben gespült und darin aufgekocht; darauf habe ich nach dem oben besprochenen Analysengang die unverarbeitete Menge der Oxalationen festgestellt.

Das ausgeschiedene Kohlendioxyd wurde durch Titration mit $^n/_{10}$-Salzsäure und Phenolphthalein als Indicator bestimmt.

II. Verbreitung des die Oxalsäure verarbeitenden Enzyms.

A. Verarbeitung des Oxalations durch chlorophyllhaltige Kryptogamen.

Zunächst habe ich einige Vertreter der Kryptogamen zur Herstellung von Trockenpulvern verwendet. Es wurden je

5,0 g des dargestellten Präparates mit 5 ccm Ammoniumoxalatlösung vermengt, nur von Spirogyra wurde 1,0 g zugesetzt; im Gegensatz zu den Versuchen mit anderen Pflanzen, die 24 Stunden dauerten, wirkte das Enzym von Spirogyra nur 6 Stunden.

Versuch	Pflanzenart	Temp. °C	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4'' Abnahme g	% der Abnahme
107	Scolopendrium vulgare Sm. .	36	0,1317	0,0532	0,0785	59,6
109	Equisetum maximum Lam. (Telmateja Ehrh.)	36	0,1315	0,0438	0,0877	66,8
108	Leucobryum spec.	35	0,1320	0,0651	0,0669	50,6
110	Polytrichum commune L. . . .	35	0,1307	0,0897	0,0410	31,4
113a	Spirogyra spec. vgl. S. 9 . . .	38	0,1025	0,0224	0,0801	78,1

Somit verarbeiten die chlorophyllhaltigen Kryptogamen das ihnen gebotene lösliche Oxalat.

B. Verarbeitung des Oxalations durch chlorophyllhaltige höhere Pflanzen.

a) Blattspreite.

Die im vorigen Abschnitt beschriebene Darstellungsmethode der Enzympräparate wurde sowohl bei säurehaltigen wie auch bei säurefreien Blättern in Anwendung gebracht. Es war jedoch nötig, die in den getrockneten Blattpulvern enthaltenen, in Essigsäure löslichen Oxalatmengen quantitativ zu bestimmen, weil diese während des Versuches ebenfalls der Verarbeitung anheimfallen. Zu diesem Zwecke wurden 5,0 g des getrockneten Blattpulvers in oben beschriebener Weise analysiert; die Werte dieser Analysen sind in Kolonne 7 der Tabelle II angeführt. In vielen getrockneten Blättern finden sich lösliche Oxalate, während in anderen Blattpulvern nur Spuren oder überhaupt keine Oxalate mehr quantitativ festgestellt werden können. Dies darf jedoch nicht zu dem Schluß verleiten, daß in letzteren Oxalate niemals gebildet werden; denn man muß bedenken, daß die Enzyme beim Trocknen, besonders bei erhöhter Temperatur, ihre Tätigkeit fortsetzen und dabei die löslichen Oxalate verarbeiten.

In den Versuchen wurden 5,0 g des getrockneten Blattpulvers verwendet und eine abgemessene Ammoniumoxalatlösung

Tabelle II.

Verarbeitung des Oxalations durch Blattpulver.

Versuchs-Nr.	Pflanzenart	Alter der Blätter	Dauer des Trocknens Std.	Temp. des Versuchs °C	Blattpulvermenge	C_2O_4'' in getr. Material g	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' nach 24 Std. gefunden g	C_2O_4'' Abnahme nach 24 Std. g	% der Abnahme	Ausgeschieden CO_2 mg
110/130	Rumex maximus	mittelalte Blätter	48	33	5,0	0,0733	0,2462	0,1793	0,1402	43,9	n. bestimmt
17/20	Rheum officinale L. (kultivierte Art)	junge Blätter . .	24	34	5,0	0,0638	0,1545	0,0495	0,1688	77,3	56,3
47/25	Oxalis Acetosella L.	junge Blätter . .	24	34	5,0	0,0515	0,1787	0,0697	0,1605	71,8	n. bestimmt
16/24	Rumex acetosa L.	mittelalte Blätter	24	34	5,0	0,0513	0,1545	0,0499	0,1559	75,5	421,1
22/18	Spinacia oleracea L.	ältere Blätter . .	60	36	5,0	0,0382	0,1791	0,1463	0,0710	32,6	75,2
46/48	Fagopyrum esculentum Mönch .	jüngere Blätter .	24	36	5,0	0,0376	0,1747	0,0620	0,1503	70,8	n. bestimmt
14/26	Prunus domestica L.	sehr alte Blätter	48	35	5,0	0,0262	0,1524	0,1588	0,0198	10,8	Spuren
33/39	Persica vulgaris Mill.	ältere Blätter . .	24	36	5,0	0,0207	0,1735	0,0933	0,1009	48,0	25,9
37/43	Vitis vinifera L.	junge Blätter . .	24	36	5,0	0,0062	0,1784	0,0079	0,1771	95,9	19,6
13/28	Pirus Malus L.	alte Blätter . . .	60	36	5,0	0,0050	0,1515	0,1372	0,0193	12,3	Spuren

84/40	Ribes rubrum L.	mittlere Blätter .	48	36	5,0	0,0026	0,1742	0,0744	0,1024	41,5	75,2
38/34	Helianthus tuberosus L. . . .	jüngere Blätter .	48	37	5,0	0,0026	0,1789	0,0136	0,1679	92,4	227,3
29/32	Prunus avium L.	jüngere Blätter .	48	37	5,0	Spuren	0,1782	0,0616	0,1166	65,3	115,3
45/42	Phaseolus vulgaris L.	sehr junge Blätter	24	36	5,0	—	0,1776	0,0660	0,1116	62,7	n. bestimmt
35/41	Helianthus annuus L.	junge Blätter. . .	24	36	5,0	—	0,1742	nichts mehr	0,1742	100,0	72,0

zugesetzt. Die Dauer der Versuche betrug 24 Stunden; während dieser Zeit wurden durchschnittlich pro Stunde und Kolben $1^1/_2$ l kohlendioxydfreie Luft durchgeleitet. Die Versuche wurden im Dunkelzimmer des botanischen Institutes ausgeführt. Als Desinfiziens wurde 1 Volum-% Toluol zugesetzt.

Aus den Versuchen geht hervor, daß alle untersuchten Blätter das ihnen von außen gebotene Oxalation vermöge eines enzymatischen Prozesses zu verarbeiten imstande sind; aber sie verarbeiten die ihnen gebotenen Oxalationen sehr ungleich stark. Die säurehaltigen Blattpulver von Oxalis, Rheum und Rumex verarbeiten während 24 Stunden bloß 77% der gesamten Oxalationen, während das säurefreie Blattpulver von Helianthus bei gleichlanger Versuchsdauer alles Oxalat verarbeitet.

Daß die Verarbeitung der Oxalationen von der Gegenwart des Sauerstoffes abhängt, hat Bassalik (1917) gezeigt.

Es könnte daher vermutet werden, daß bei den säurehaltigen Nichtsucculenten ähnliche Verhältnisse vorliegen wie bei den Succulenten, so daß infolge verminderter Sauerstoffzufuhr die Oxalate nicht in dem Maße verarbeitet werden, wie sie entstehen, was zu einer Anhäufung der Oxalate führen würde. Da aber die Blätter von Oxalis, Rheum und Rumex keine besonderen anatomischen Eigentümlichkeiten zeigen, die auf eine Erschwerung des Gaswechsels hinweisen, ist diese Vermutung hinfällig. Es wäre aber denkbar, daß bei den säurefreien Blättern, wie Helianthus, in denen kein lösliches Oxalat

gefunden wird, die entstehenden Oxalate durch die rege Tätigkeit des Enzyms stets verarbeitet werden und daß es darum zu keiner Ablagerung löslicher Oxalate komme. Bei den anderen säurefreien Pflanzen, die eine trägere Oxalatverarbeitung zeigen, würden die nicht in den enzymatischen Prozeß hineingezogenen Oxalationen als neutrale Kalium- oder Calciumsalze festgelegt. Bei den säurehaltigen Blättern müßte dann das nicht der Verarbeitung anheimfallende Oxalat als saures Kaliumsalz (Kleesalz) im Zellsaft gefunden werden.

Aus den Versuchen geht auch hervor, daß bei den meisten Pflanzen nicht sämtliches Oxalat verarbeitet wird. Diese Eigentümlichkeit ist für enzymatische Prozesse nichts Außergewöhnliches. Die Enzyme sind äußerst labile Gebilde, die durch die geringsten Einflüsse in ihren Wirkungen gehemmt oder sogar zerstört werden. Besonders empfindlich sind sie gegenüber Änderungen der Konzentration der Wasserstoffionen, die zum Stillstand des Prozesses führen können. In der Tat hat die Flüssigkeit während der Versuchsdauer die Menge ihrer Wasserstoffionen geändert. Am Anfang war die Lösung oft schwach sauer, während nach Abbruch des Versuchs stets eine alkalische Reaktion festgestellt werden konnte.

Nicht nur die Änderung der Wasserstoffionen-Konzentration kann auf die Verarbeitung hemmend wirken, sondern auch die entstehenden Spaltungsprodukte. Das Kohlendioxyd, sowie das Ammoniak, die bei der Verarbeitung auftreten, werden teilweise durch den Luftstrom, der durch die Versuchskolben geleitet wird, weggeführt. Es entstehen aber nicht nur diese beiden Spaltungsprodukte; denn im Blattpulver befindet sich noch ein ganzer Komplex anderer Enzyme, z. B. solche, die Kohlenhydrate, Fette und Eiweißkörper zu hydrolisieren vermögen; die Abbauprodukte aller dieser Stoffe wirken möglicherweise auf das oxalatverarbeitende Enzym schädigend ein.

Außerdem kann noch eine gegenseitige ungünstige Beeinflussung der Enzyme stattfinden und zu ihrer allmählichen Vernichtung führen. Tammann (1895) hat bei seinen Untersuchungen über das Emulsin festgestellt, daß die enzymatischen Vorgänge aus zwei untereinander eng verknüpften Prozessen bestehen: aus der eigentlichen Enzymwirkung und dem Enzymzerfall, welch letzterer besonders in wäßriger Lösung und bei

erhöhter Temperatur vor sich geht. Dieser könnte ebenfalls zum Stillstand der Verarbeitung führen. Nun ist für viele Enzyme festgestellt worden, daß die Gegenwart derjenigen Stoffe, auf die sie einwirken, ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Zerfall bedeutend erhöhen. Da aber in unseren Versuchen das Enzym stets in Gegenwart von Oxalationen arbeitet, kann nicht der Zerfall des Enzyms schuld daran sein, daß der Prozeß meist nicht zu Ende geführt wird.

Es soll aber auch nicht unerwähnt bleiben, daß durch die allgemeine Enzymtätigkeit Produkte gebildet werden, die den Prozeß beschleunigen können. Auch die verschiedenartige quantitative und qualitative Zusammensetzung der Aschenbestandteile könnte im gleichen Sinne wirken.

Aus Versuch 13, 14 und 37 Tabelle II geht hervor, daß eine weitere Ursache der verschieden starken Verarbeitung auf dem Alter der Blätter beruht. In jüngeren noch wachsenden Blättern findet im allgemeinen ein lebhafterer Stoffwechsel statt als in älteren, ausgewachsenen, und dementsprechend auch bei ersteren eine stärkere Oxalatverarbeitung.

Von den Spaltprodukten wurde nur das Kohlendioxyd bestimmt. Da in keinem Falle eine Proportionalität zwischen der verarbeiteten Oxalatmenge und der ausgeschiedenen Kohlendioxydmenge gefunden werden konnte, liegt die Vermutung nahe, daß das Kohlendioxyd nicht das einzige Produkt der Verarbeitung ist.

Über die Resultate der Tabelle II kann zusammenfassend gesagt werden, daß die Blätter der säurehaltigen wie der säurefreien Pflanzen ein Enzym besitzen, das die Oxalationen zu verarbeiten vermag.

b) Stengel und Blattstiele.

Nachdem das Vorhandensein eines die Oxalationen verarbeitenden Enzyms in den Blattspreiten, den eigentlichen Assimilationsorganen, nachgewiesen war, mußte festgestellt werden, ob ein solches auch in den vorwiegend für die Leitung der Stoffe eingerichteten Organen, den Blattstielen und Stengeln, vorhanden ist. Zu den Versuchen mußte möglichst junges, saftreiches Material verwendet werden, da alte verholzte Stengel von vornherein keine guten Resultate erwarten ließen. Die

Versuche wurden mit jungen Sprossen von Asparagus officinale und Blattstielen von Rumex maximus ausgeführt.

Zu 5,0 g Asparaguspulver wurden zugesetzt . . . . . 0,1751 g C_2O_4''
Trockenmaterial enthält kein lösliches Oxalat.
Nach 24 Stunden wurden gefunden . . . . . 0,1338 g C_2O_4''
Nach 24 Stunden bei 36° verarbeitet . . . . . 0,0413 g C_2O_4''
= 23,6 %

Zu 5,0 g Rumexstengelpulver wurde zugesetzt . . . . 0,2090 g C_2O_4''
5,0 g Trockenmaterial enthielt . . . . . 0,2180 g C_2O_4''
Total . . . 0,4270 g C_2O_4''
Nach 24 Stunden wurden gefunden . . . . . 0,1443 g C_2O_4''
Während 24 Stunden wurden bei 37° verarbeitet . . 0,2827 g C_2O_4''
= 66,2 %

Zu 5,0 g Rumexstengelpulver wurde zugesetzt . . . . 0,0937 g C_2O_4''
5,0 g Trockenmaterial enthielt . . . . . 0,2180 g C_2O_4''
Total . . . 0,3117 g C_2O_4''
Nach 24 Stunden wurde gefunden . . . . . 0,1096 g C_2O_4''
Während 24 Stunden wurden bei $36^1/_2{}^0$ verarbeitet . 0,2021 g C_2O_4''
= 64,8 %

Diesen Versuchen ist zu entnehmen, daß die Stengel und Blattstiele die ihnen von außen zugesetzten Oxalationen zu verarbeiten vermögen. Hier ließe sich ein Versuch anschließen, der mit einer Succulenten, Mesembryanthemum linguae, ausgeführt wurde.

Zu 2,0 g getrocknetem Blattpulver wurde zugesetzt . . 0,2000 g C_2O_4''
Von 2,0 g wurden in Essigsäure gelöstes Calcium gebunden . . . . . 0,854 g C_2O_4''
Rest . . . 0,1146 g C_2O_4''
Nach Abbruch des Versuchs wurde gefunden . . . 0,1043 g C_2O_4''
In 24 Stunden wurden bei 37° verarbeitet . . . . . 0,0103 g C_2O_4''
= 9,1 %

Dieser Versuch zeigt, daß auch die Succulente Mesembryanthemum die Oxalsäure verarbeiten kann. Nach der Untersuchung von Spoehr (1913) soll bei den Succulenten der Entsäuerungsprozeß nur eine photochemische Reaktion sein. Dieser Ansicht tritt aber mein Versuch entschieden entgegen, der die Verarbeitung als einen enzymatischen Prozeß erweist. Von einer Verallgemeinerung dieser Tatsache für andere Succulenten sehe ich vorderhand noch ausdrücklich ab.

c) Wurzeln.

Die Versuche wurden mit Wurzeln von Lupinus albus und von Phaseolus vulgaris durchgeführt.

Zu 1,0 g Pulver von Phaseoluswurzeln wurde zugesetzt 0,1448 g C_2O_4''
Nach dem Versuch wurde gefunden . . . . . 0,0978 g C_2O_4''
In 3 Stunden wurde bei 37° verarbeitet . . . . . 0,0470 g C_2O_4''
= 32,4%
Zu 1,0 g Pulver von Lupinus wurde zugesetzt . . . . 0,1448 g C_2O_4''
Nach dem Versuch wurde gefunden . . . . . 0,0906 g C_2O_4''
In 3 Stunden wurde bei 37° verarbeitet . . . . . 0,0542 g C_2O_4''
= 37,4%

Auch bei diesen Versuchen mit Wurzelpräparaten wird das zugesetzte Oxalation durch einen enzymatischen Prozeß verarbeitet.

d) Gekeimte und ungekeimte Samen.

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, daß die verschiedensten ausgewachsenen Pflanzenteile die Fähigkeit der Verarbeitung des Oxalations besitzen. Es war nun von Interesse zu untersuchen, ob auch die Samen diesen enzymatischen Prozeß durchführen können. Die ungekeimten Samen wurden

Tabelle IIIa.

Verarbeitung der Oxalationen durch Samenpulver.

Versuch	Samenpulver	Dauer der Keimung	Temp. °C	Rohproteingehalt %	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden n. 24 Std. g	C_2O_4'' Abnahme nach 24 Std. g	% der Abnahme	Kohlendioxydmenge mg	Differenz d. Abbaus ungek. u. gekeimt. Samen %
8	Lupinus albus . . .	4 Tage	35	—	0,1607	0,1159	0,0448	27,9	33,5	— 3,0
1	„ „ . . .	ungek.	35	44,48	0,1650	0,1139	0,0511	30,9	48,9	
11	Glycine Soya	6 Tage	36	—	0,1639	0,1087	0,0552	33,7	120,1	+ 8,9
2	„ „	ungek.	37	38,44	0,1642	0,1232	0,0410	24,9	67,9	
10	Vicia Faba L. . . .	3 Tage	36	—	0,1640	0,1300	0,0340	20,7	52,0	+ 8,1
3	„ „	ungek.	36	22,81	0,1650	0,1441	0,0209	12,6	52,1	
101	Pisum sativum L. . .	8 Tage	35	—	0,1590	0,0594	0,0996	58,3	n. bestimmt	+ 40,1
5	„ „ . .	ungek.	36	21,50	0,1642	0,1322	0,0300	18,2	163,4	
9	Triticum vulgare . .	4 Tage	36	—	0,1597	0,1276	0,0321	20,1	37,2	± 0
6	„ „ . .	ungek.	36	13,9	0,1625	0,1298	0,0327	20,1	46,4	
111	Avena sativa L. . . .	6 Tage	36	—	0,1874	0,0695	0,1179	62,9	n. bestimmt	+ 37,6
196	„ „ . . .	ungek.	37	13,1	0,2090	0,1561	0,0539	25,3	n. bestimmt	
106	Hordeum vulgare L. .	5 Tage	36	—	0,1565	0,1003	0,0562	35,9	n. bestimmt	+ 4,8
197	„ „ .	ungek.	37	12,56	0,2090	0,1439	0,0651	31,1	n. bestimmt	
112	Secale cereale Vill. .	5 Tage	36	—	0,1339	0,0677	0,0662	49,4	n. bestimmt	+ 27,7
198	„ „ „ . .	ungek.	37	12,48	0,2090	0,1536	0,0454	21,7	n. bestimmt	
81	Fagopyrum esculentum Mönch	6 Tage	36	—	0,1800	0,0739	0,1061	57,7	167,4	+ 21,4
113	Desgl.	ungek.	36	11,66	0,1590	0,1012	0,0578	36,3	n. bestimmt	
30	Zea mais L.	5 Tage	36	—	0,1791	0,0748	0,1053	58,1	48,6	+ 8,9
102	„ „	ungek.	37	10,91	0,1594	0,0810	0,0784	49,2	n. bestimmt	

ohne jede Vorbehandlung zur Darstellung eines Enzympräparates verwendet. Die zur Keimung bestimmten Samen wurden in Wasser bei 25° im Thermostaten während 24 Stunden zur Quellung gebracht; dann kamen sie in einen feuchten Raum des Dunkelzimmers und blieben dort so lange, bis die Wurzeln der Dicotylensamen resp. die Koleoptile der Gramineen die Länge von 1 cm erreicht hatten. Dann wurde nach dem auf S. 9 ausgeführten Verfahren das Trockenpräparat dargestellt.

Zu den Versuchen wurde 5,0 g getrocknetes Samenpulver mit ungefähr $^1/_2$ %iger Ammoniumoxalatlösung gemengt. Versuchsdauer 24 Stunden; pro Kolben und Stunde wurde $1^1/_2$ l kohlendioxydfreie Luft durchgeleitet.

Aus den Versuchen ergibt sich, daß die gekeimten und ungekeimten Samen die ihnen von außen gebotenen Oxalationen zu verarbeiten imstande sind. Die Verarbeitung ist bei den gekeimten im allgemeinen energischer als bei den ungekeimten Samen. Dies hängt offenbar mit dem Keimungsprozeß zusammen, durch den der latente Stoffwechsel des ruhenden Samens angeregt und die Produktion von Enzymen gesteigert wird. Diese formen die Reservestoffe, welche im Samen abgelagert sind, so um, daß sie für den Aufbau des Keimlings ausgenutzt werden können.

Wenn ich nun aus Tabelle IIIa die von gleichaltrigen Stadien der verschiedenen Versuchspflanzen verarbeitete Oxalatmenge zusammenstelle und daraus die mittleren Werte berechne, so erhalte ich Tabelle IIIb.

Tabelle IIIb.

	Ungekeimte Samen	Gekeimte Samen (Alter in Tagen)				
		3	4	5	6	8
	%	%	%	%	%	%
Mittel aus der verarbeiteten C_2O_4'' in %	27	21	24	47	52	58

Obwohl die Versuchspflanzen sehr verschiedenartig sind und deshalb die Zahlen nur Annäherungswerte repräsentieren, darf aus ihnen doch der Schluß gezogen werden, daß die älteren Keimlinge die Oxalsäure stärker verarbeiten als die jüngeren, und ferner, daß die ungekeimten Samen im allgemeinen stärker arbeiten als die 3- und 4tägigen Keimlinge

Eine Ausnahme machen Lupinus albus und Triticum vulgare; bei ersterem ist die Verarbeitung im gekeimten Samen schwächer als im ungekeimten; bei letzterem konnte in der Wirkungsweise der aus gekeimten und ungekeimten Samen hergestellten Präparate kein Unterschied festgestellt werden. Die oben angeführten Resultate stehen zwar auf schwacher Grundlage, da zu wenig Tatsachen vorliegen. Doch ist die Möglichkeit vorhanden, dieselben mit den Palladinschen Ergebnissen in Beziehung zu bringen. Dieser Forscher (1896) hat nämlich gefunden, daß während der Keimung des Weizens und der Lupine die Nucleoproteide, die er mit dem Protoplasma identifiziert, nach anfänglicher Abnahme wieder zunehmen. Dies würde die schwächere Verarbeitung der Oxalsäure bei den 3- und 4tägigen Keimlingen einigermaßen erklären. Der Einfluß der Gesamteiweißmenge auf den Abbau der Oxalsäure ist zweifelhaft.

e) Farblose Blumenblätter.

Die weißen Blumenblätter einer kultivierten Pensée-Racé (Viola) führten zu folgendem Resultat:

Zu 5,0 g trockenem Pulver zugesetzt: 0,1874 g C_2O_4''
Nach 24 Stunden gefunden . . . . . 0,0800 g C_2O_4''
0,1074 g C_2O_4''
folglich verarbeitet: 57,3%.

f) Verschiedene Organe normal gewachsener Lupinen.

20 Samen von Lupinus albus wurden am 16. V. 18 während 24 Stunden in Wasser von 25° zur Quellung veranlaßt, am 27. V. 18 in groben Sand gesetzt und täglich mit 0,1%iger Ohlmannscher Nährlösung begossen. Am 18. VI. 18 wurden die Pflanzen zum Trocknen geerntet und pulverisiert. 1,0 g der getrockneten Pulver wurde mit 50 ccm ½%iger Ammoniumoxalatlösung gemischt und der Versuch während 3 Stunden wie üblich durchgeführt; Temperatur 37°.

Tabelle IV.
Verschiedene Organe normal gewachsener Lupinen.

Vers.	Verwendetes Pflanzenorgan	frisch gewogen g	luft-trocken gewogen g	%	C_2O_4'' zuges. g	C_2O_4'' gef. g	C_2O_4'' Abn. g	Abn. %
184	Wurzel	16,70	1,3	7,9	0,1448	0,0906	0,0542	37,4
185	Kotyledonen .	51,32	5,35	9,8	0,1448	0,0981	0,0467	32,2
186	Stengel	37,15	2,81	7,6	0,1448	0,0669	0,0779	53,8
187	Blätter	17,91	2,51	13,9	0,1448	0,0893	0,0555	37,3

Die Verschiedenheit in der Menge des verarbeiteten Oxalations kommt deutlich zum Ausdruck, indem die Kotyledonen am wenigsten, die Blätter und Wurzeln etwas mehr und der Stengel weitaus am stärksten arbeiten. Diese Eigentümlichkeit hängt offenbar mit dem regeren oder trägeren Stoffwechsel der einzelnen Organe zusammen.

C. Verarbeitung des Oxalations durch etiolierte Pflanzen.

Bis jetzt haben wir normal entwickelte Pflanzenorgane auf die Oxalatverarbeitung hin untersucht. Wie sich Pflanzenorgane, die unter Lichtabschluß gewachsen sind, in dieser Hinsicht verhalten, soll im folgenden untersucht werden.

20 Samen von Phaseolus vulgaris wurden am 4. V. 18 nach 24stündigem Quellen bei 25° in Töpfe mit guter Lauberde gesetzt und bis zum 7. VI. 18 bei einer Temperatur von 18 bis 20° im Dunkelkasten gelassen. Die Pflanzen etiolierten und bildeten lange Stengel und kleine, gelbe, runzelige Blätter. Nach ungefähr 4wöchigem Aufenthalt im Dunkeln wurden sie getrocknet und pulverisiert. Bei den Versuchen wurde 1,0 g getrocknetes Organpulver verwendet, zu dem 50 ccm $^1/_2$%ige Ammoniumoxalatlösung zugesetzt wurde. Im übrigen stimmte die Versuchsanordnung mit der bei grünen Pflanzen angewendeten genau überein. Die Versuche wurden bei 37° ausgeführt und dauerten 3 Stunden, bei Solanum 24 Stunden bei 36°.

Tabelle V.

Verschiedene Organe etiolierter Pflanzen.

Vers.	Verwendetes Organ	frisch gewogen g	luft-trocken gewogen g	%	C_2O_4'' zuges. g	C_2O_4'' gef. g	C_2O_4'' Abn. g	Abn. %
180	Phaseol.-Wurzel	40,21	2,51	6,2	0,1448	0,0978	0,0470	32,4
181	„ -Kotyledonen	50,20	7,35	14,6	0,1448	0,1043	0,0405	27,9
182	„ -Stengel . .	315,22	25,22	8,0	0,1448	0,0854	0,0594	41,0
183	„ -Blätter . .	10,10	1,51	14,9	0,1448	0,0612	0,0836	57,7
	Solanum tuberosum-Stengel	320,5	30,6	9,5	0,1874	0,0634	0,1240	66,1

Die Versuche ergeben, daß auch die etiolierten Pflanzen die ihnen zugesetzten Oxalationen zu verarbeiten vermögen, und zwar ihre verschiedenen Organe in verschiedenem Maße. Die Blätter verarbeiten das Oxalation am stärksten, die Stengel und Wurzeln nehmen eine Mittelstellung ein, während die Kotyledonen die geringste Abnahme des Oxalats aufweisen. Dies

ist vielleicht auf die in den Kotyledonen gespeicherten Reserveproteine zurückzuführen, die möglicherweise das Enzym z. T. adsorbieren und nicht zur Wirkung kommen lassen. Dieses verschiedene Verhalten der einzelnen Organe in bezug auf die Verarbeitung des Oxalations wurde auch bei der normal entwickelten Lupinuspflanze beobachtet (vgl. S. 23).

Obwohl zu den mit grünen und etiolierten Individuen ausgeführten Versuchen verschiedene Pflanzenarten verwendet wurden, so ist doch zu erkennen (Tabelle IV und V), daß die grünen Pflanzenteile in der Verarbeitung des Oxalations den etiolierten überlegen sind; eine Ausnahme machen nur die Blätter.

Um festzustellen, ob dieses auffallende Resultat nur auf die Verschiedenheit der untersuchten Spezies oder auf den verschiedenen Zustand der Pflanzen zurückzuführen ist, habe ich folgenden Versuch mit Phaseolus ausgeführt:

Es wurden 4 Wochen alte Blätter von Phaseolus, die im Gewächshaus wuchsen, getrocknet und die Wirkung des daraus gewonnenen Pulvers mit demjenigen etiolierter Pflanzen verglichen.

Vers.	Phaseolus-Blätter	frisch gewogen g	luftrocken gewogen g	%	In 100 Tl. Frischgew. Eiweißstoffe nach Palladin %
183	etioliert	10,10	1,51	14,9	8,38
190	grün	95,10	11,10	11,6	4,95

Vers.	Phaseolus-Blätter	Menge d. Blattpulvers g	Temperatur °C	Dauer d. Vers. Std.	C_2O_4'' gegeben g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4'' Abnahme g	%
183	etioliert .	1,0	37	3	0,1448	0,0612	0,0836	57,7
190	grün . .	1,0	37	3	0,1448	0,0431	0,1017	70,2

Dieser Versuch zeigt, daß das normale Blatt die Oxalationen stärker abzubauen vermag als das etiolierte, und daß der in Tabelle IV und V enthaltene Widerspruch durch die Verschiedenheit der verwendeten Spezies bedingt ist.

Wenn wir den Eiweißgehalt der grünen mit demjenigen

der etiolierten Blätter an Hand von Palladins (1891) Angaben vergleichen, so zeigt sich, daß die etiolierten Blätter eiweißreicher sind als die grünen.

Man sollte nun erwarten, daß das eiweißreichere Organ dem eiweißärmeren in der enzymatischen Leistung überlegen sei, weil die plasmareiche Zelle mehr Enzym zu bilden vermag als die plasmaarme. Dies scheint bei den etiolierten Phaseolusblättern nicht zuzutreffen, doch kann ihr Verhalten durch einen anderen Befund Palladins (1892) wenigstens zum Teil erklärt werden. Er fand nämlich, daß die Blätter normaler grüner Phaseoluspflanzen aschenreicher sind als die der etiolierten; besonders stellte er starke Unterschiede im Kalium-, Calcium- und Eisengehalt fest. Daß anorganische Ionen enzymatische Reaktionen beschleunigen, ist bekannt. Nach den Untersuchungen von A. Bach (1910) wären den Metallsalzen, speziell dem Mangan und dem Eisen bei oxydierenden Enzymen die Rolle von Aktivatoren zuzuschreiben, und Stoklasa (1916) konnte bei seinen Atmungsversuchen an der Zuckerrübe feststellen, daß das Kaliumion für die Mechanik der physiologischen Verbrennung in chlorophyllhaltigen und chlorophyllfreien Zellen unentbehrlich sei.

Ich lasse eine kleine Tabelle folgen, in der ich den Aschengehalt der grünen und etiolierten Phaseolusblätter nach Palladins (1911) Pflanzenphysiologie zusammengestellt habe.

Tabelle VI.

Aschengehalt grüner und etiolierter Phaseolusblätter.

Reinasche auf 1000 g	K_2O	CaO	MgO	Fe_2O_3	P_2O_5	SO_3	SiO_2
grün 103,0 g . . .	44,9	13,3	6,6	1,1	21,9	8,3	5,6
etioliert 75,4 g . . .	34,5	2,6	4,0	0,3	32,5	1,2	6,6

Die stärkere Oxalatverarbeitung durch Pulver aus grünen Blättern braucht allerdings nicht allein auf dem höheren Aschengehalt und dessen verschiedener quantitativer und qualitativer Zusammensetzung zu beruhen. Denn es ist nicht außer acht zu lassen, daß durch die abnormen Wachstumsbedingungen der etiolierten Pflanzen das Protoplasma und dessen gesamter Stoffwechsel sehr ungünstig beeinflußt wird. In Verbindung damit erfahren auch die enzymatischen Prozesse im allgemeinen und

der Abbau des Oxalations im besonderen eine Verschiebung zu Ungunsten der etiolierten gegenüber dem der normalen Pflanze.

D. Verarbeitung des Oxalations durch Preßsaft und Enzympulver.

a) Preßsaft.

Die Versuche mit Blattpulver von Helianthus annuus haben gezeigt, daß dieser die Oxalationen energisch verarbeitet. Es war deshalb zu erwarten, daß Helianthus ein günstiges Objekt zur Gewinnung eines reineren Enzympräparates sei. Zu diesem Zwecke wurde ein Kilogramm frischer Helianthusblätter gesammelt und die Blattmasse mittels einer Fleischhackmaschine zerkleinert. Da durch das bloße Zerhacken die Zellen der Blätter nur wenig verletzt werden, so daß nur eine verhältnismäßig geringe Menge des Zellinhaltes gewonnen worden wäre, habe ich mit Hilfe von sterilem Quarzsand, den ich portionenweise dem Blätterbrei zusetzte, die Masse in einer Reibschale zerrieben und dadurch die Ausbeute an gelöstem Zellinhalt erhöht. Dieser Brei wurde in ein starkes Leinentuch eingehüllt und unter dem Druck einer Ölpresse von 300 Atmosphären ausgepreßt. Der Preßsaft wurde in einem sterilen Kolben aufgefangen. 1 kg Blätter lieferte 680 ccm Saft, der leicht gelb gefärbt, aber klar war und neutral reagierte. Er enthielt koagulierbares Eiweiß, was aus dem beim Erhitzen einer Probe entstehenden Niederschlag, welcher Eiweißreaktion zeigte, geschlossen werden muß.

Einen Teil des Preßsaftes habe ich sofort zu Versuchen verwendet, um seine Wirksamkeit in bezug auf die Verarbeitung des Oxalations kennen zu lernen.

Zu diesem Zwecke wurde in den Versuchskolben eine bestimmte Ammoniumoxalatmenge abgewogen und mit der Pipette 25 ccm des Preßsaftes, eventuell noch 25 ccm dest. Wasser, sowie 2 ccm Toluol zugesetzt.

Die Versuchsanordnung und der Analysengang war derselbe wie bei den mit Blattpulvern ausgeführten Versuchen. Temperatur 36°, Dauer 24 Stunden. Die Resultate sind in Tabelle VII zusammengestellt.

Tabelle VII.

Versuch	Zusatz zum Preßsaft	Zugesetzt g	Gefunden g	Abnahme g	%	Reaktion d. Med. v. Vers.	n. Vers.
73	25 ccm ohne Zusatz	0,2111	0,1140	0,0971	46,0	neutr.	alkal.
74	25 ccm + 25 ccm aq. dest.	0,2320	0,0916	0,1404	60,4	„	„
75	25 ccm + 25 ccm aq. dest.	0,2520	0,0990	0,1530	60,7	„	„
76	Kontrolle	0,2435	0,2431 [1])	—	—	„	neutr.

Die Versuche zeigen zur Evidenz, daß der Preßsaft von Helianthus eine starke oxalatverarbeitende Wirkung besitzt, und daß die Verarbeitung von der Konzentration des Oxalats abhängt, indem bei höherer Konzentration des Oxalats (Versuch 73) eine geringere Abnahme stattfindet als bei niedrigerer Konzentration (Versuch 74 und 75).

Der Preßsaft verarbeitet das zugesetzte Oxalat nicht so prompt, wie das Blattpulver von Helianthus; nach 24 stündiger Versuchsdauer hat ersterer nur 60 % letzterer aber alles Oxalat verarbeitet.

Die 25 ccm Preßsaft entsprechen nicht den 5,0 g trockenen Blattpulvers, was aus folgender Berechnung hervorgeht.

1000	g	frischer	Blätter	geben	680	ccm	Preßsaft
1	g	„	„	„	0,68	„	„
317	g	„	„	sind	59,1	g	trockene Blätter
18,5	g	trockene	„	„	100,0	g	frische „
5,0	g	„	„	„	27,0	g	„ „

Die 27,0 g frische Blätter geben nur 18,36 ccm Preßsaft. Die 25 ccm des Preßsaftes entsprechen ungefähr 6,6 g trockenen Blattpulvers; trotzdem bleibt die Wirksamkeit des Preßsaftes hinter dem des Blattpulvers zurück, von welchem 5 g unter gleichen Bedingungen sämtliche Oxalationen verarbeiteten.

Wie ich auf S. 18 hervorgehoben habe, übt eine Änderung der Wasserstoffionen-Konzentration auf die Enzyme eine schädigende Wirkung aus. Wie aber Rosenthaler (1910)

[1]) Kontrolle ausgeführt, um den durch das Krystallwasser des Ammoniumoxalats verursachten Fehler zu ermitteln.

gezeigt hat, sind Kolloide, speziell Eiweißstoffe, imstande, die Enzyme gegen die Schädigung der Wasserstoffionen zu schützen. Da nun das Blattpulver mehr Kolloide enthält (Cellulose, unlösliche Eiweißstoffe) als der Preßsaft, so kann dessen geringere Leistung auf die geringere Menge der darin enthaltenen Schutzkolloide zurückgeführt werden.

b) Enzympulver.

Der Rest des Preßsaftes wurde mit $3^1/_2$ Liter $95\,^0/_0$igem Alkohol gefällt; es bildete sich rasch ein voluminöser Niederschlag, der sehr bald eine braune Färbung annahm. Dieser Niederschlag wurde möglichst rasch abfiltriert, in dünner Schicht auf sterile Glasplatten gestrichen und im Trockenschrank bei 40^0 getrocknet. Die trockene Masse wurde in einer Reibschale fein zerrieben und gab ein braunes Pulver. Die Ausbeute betrug 18 g. Von einer weiteren Reinigung wurde abgesehen, weil eine solche mit erheblichen Verlusten verbunden ist. Das Präparat wurde in einem Calciumchloridexsiccator im Dunkeln aufbewahrt.

Wegen äußerer Umstände konnte es erst am 13. Dezember 1917, 3 Monate nach seiner Darstellung, zu Versuchen verwendet werden; ihre Ergebnisse sind in Tabelle VIII zusammengestellt; Temperatur 36^0.

Tabelle VIII.

Versuch	Datum des Versuchs	Enzymmenge g	Dauer des Vers. Std.	Ammoniumoxalat zugesetzt g	gefunden g	Abnahme g	%	Reaktion d. Med. vor Vers.	nach Vers.
140	3. XII. 17	0,3593	12	0,1571	0,0744	0,0827	52,6	sauer	sauer
141	13. XII. 17	0,4277	24	0,1588	0,0704	0,0884	55,6	„	„
146	27. V. 18	0,1500	24	0,1872	0,1184	0,0688	36,7	„	alkal.

Durch die Alkoholfällung des Preßsaftes erhalten wir ein Pulver, das die zugesetzten Oxalationen zu verarbeiten vermag, allerdings nicht so intensiv wie das Blattpulverpräparat, obwohl die Enzymmenge der Blattpulvermenge annähernd entspricht:

Aus 1000 g frischen Blättern wurden 18 g Pulver erhalten,
„ 1 g „ „ „ 0,018 g „ „
5 g trockener Blätter sind 27,0 g frische Blätter;
aus diesen wurden $27{,}0 \times 0{,}018 = 0{,}4860$ g Pulver gewonnen.

Der Unterschied in der Wirksamkeit des Enzympräparats im Vergleich zu demjenigen des Blattpulvers kann dadurch bedingt sein, daß während des Fällens und Abfiltrierens des Niederschlags der Alkohol eine Schädigung auf das Enzym ausgeübt hat. Außerdem kann die Konzentration der Oxalationen für das isolierte Enzym ungünstiger sein als für das im Blattpulver enthaltene. Endlich könnte der saure Charakter des Enzympräparates auf den Prozeß ungünstig einwirken.

Im dritten Versuch, der erst 5 Monate nach den beiden ersten ausgeführt wurde, war die Konzentration des Oxalats ungefähr dieselbe wie in den beiden ersteren, die Konzentration des Enzyms dagegen halb so hoch. Wie ich auf S. 39 zeigen werde, nimmt die Verarbeitung des Oxalats nicht proportional, sondern nur mit der Quadratwurzel der Enzymmenge zu. Diese Gesetzmäßigkeit (Schützsche Regel) auf unseren Versuch angewendet ergibt, daß das Enzympräparat theoretisch 39 % des zugesetzten Oxalats hätte verarbeiten sollen. Da es in Wirklichkeit nur etwas weniger, d. h. 36,7 % verarbeitete, hat es in 5 Monaten von seiner Wirksamkeit sozusagen nichts eingebüßt.

E. Kinetik der Oxalatverarbeitung.

Die bisherigen Ergebnisse meiner Untersuchungen beweisen, daß die Verarbeitung des Oxalations bei allen untersuchten Pflanzen ein enzymatischer Prozeß ist.

In den folgenden Ausführungen soll festgestellt werden, welchen allgemeinen Gesetzen der Enzymreaktionen die Oxalatverarbeitung unterworfen ist.

a) Einfluß der Temperatur.

Einfluß hoher Temperatur auf die Existenz der Enzyme.

Als Beweis für die enzymatische Natur der Verarbeitung der Oxalsäure, wie für das Vorhandensein eines Enzyms überhaupt, gilt allgemein die Tatsache, daß die organischen Katalysatoren (Enzyme) durch hohe Temperatur (100°) vernichtet werden. Diese Zerstörung kann mit der Eiweißnatur des Enzyms in Zusammenhang stehen. Ich habe bei Rumex acetosa und Helianthus annuus Versuche in dieser Richtung angestellt.

Eine Probe des trockenen Blattpulvers beider Pflanzen wurde während einer Stunde im Trockenschrank auf 120° erhitzt und dann abgekühlt zum Versuch verwendet. Eine andere Probe des Blattpulvers wurde in Wasser 5 Minuten zum Sieden erhitzt (Temperatur 98°).

Die Resultate dieser Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt; Dauer 24 Stunden.

Tabelle IX.

Versuch	Vorbehandlung Temp. °C	Vorbehandlung Dauer	Menge des Blattpulvers g	C_2O_4'' im Blattpulver g	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	Abnahme %
			Rumex (Temperatur 35°).				
49	Keine Vorbehandl.		5,0	0,0513	0,1768	0,0524	77,0
50	120	1 Std.	5,0	0,0513	0,1782	0,1091	52,4
121	98	5 Min.	5,0	0,0513	0,1527	0,1399	31,4
			Helianthus (Temperatur 30°).				
120	Keine Vorbehandl.		2,0	—	0,1527	0,1527	100
122	120	1 Std.	2,0	—	0,2566	0,0696	27,1
119	98	5 Min.	2,0	—	0,1234	0,1234	0

Aus den Versuchen Nr. 50 und 122 geht hervor, daß ein 1 stündiges trockenes Erhitzen der Blattpulver nur eine Schädigung, nicht aber die völlige Aufhebung der Wirksamkeit der Präparate zur Folge hat. Nehmen wir nun an, daß während der zu Beginn der Vorbehandlung einsetzenden allmählichen Temperatursteigerung die im Blattpulver von Rumex enthaltenen 0,0513 g löslichen Oxalate verarbeitet wurden, so folgt, daß von den 0,1782 g zugesetzten Oxalats nur 37,9 % verarbeitet wurden, während im Kontrollversuch ohne jede Vorbehandlung 77,0 % der Oxalationen der Verarbeitung anheimgefallen sind. Beim Helianthusblattpulver, in dem kein lösliches Oxalat festgestellt werden konnte, erreichte die Verarbeitung des auf 120° erhitzten trockenen Blattpulvers bloß den Wert von 27,1 %, während in der Kontrolle kein Oxalat mehr festgestellt werden konnte. Die enzymatische Leistung des auf 120° erhitzten Blattpulvers von Rumex ist auf die Hälfte gesunken, bei Helianthus hat sie sogar um das $^3/_4$fache abgenommen. Im trockenen Zustand ist somit das Enzym

gegen Erhitzen sehr resistent, was übrigens schon auf S. 13 gezeigt wurde. Die in Gegenwart von Wasser auf 98° erhitzten Präparate, Versuch Nr. 121 und 119, haben von ihrer Wirksamkeit bedeutend mehr eingebüßt oder sie sogar ganz verloren. Auch hier ist die Vermutung berechtigt, daß die im Blattpulver von Rumex enthaltenen löslichen Oxalate der enzymatischen Verarbeitung anheimgefallen sind; trotzdem sind von den zugesetzten Oxalationen 0,0128 g = 8,4% verarbeitet worden.

Im Helianthusblattpulver, in dem keine löslichen Oxalate gefunden wurden, hat das Kochen des Blattpulvers das Enzym vollständig zerstört. Das verschiedene Verhalten des Rumex- und Helianthusblattpulvers nach der Behandlung mit feuchter Hitze könnte damit erklärt werden, daß die bei Rumex vorhandenen löslichen Oxalate das Enzym vor der Zerstörung durch Siedehitze schützen, während bei Helianthus, dem die löslichen Oxalate fehlen, bei dem also eine solche Schutzwirkung ausgeschlossen ist, das Enzym im kochenden Wasser seine Wirksamkeit einbüßt.

Einfluß verschiedener Temperatur auf die Verarbeitung des Oxalations.

Die Versuche, die die Abhängigkeit von Temperatur und enzymatischer Verarbeitung des Oxalations klarlegen sollen, wurden mit Rumex acetosa, und zwar folgendermaßen ausgeführt:

In die Versuchskolben wurde eine abpipettierte Menge Ammoniumoxalat gebracht und die Kolben eine halbe Stunde im Wasserbad auf die gewünschte Temperatur vorerwärmt, so daß die Ammoniumoxalatlösung die Temperatur des Wasserbades annahm. Darauf wurde 1,0 g des Rumexblattpulvers zugesetzt, das Zimmertemperatur hatte. Dadurch wurden die Temperaturen über 30° zunächst um 1 bis 2° herabgesetzt; nach 2 Minuten jedoch war der Ausgleich zwischen der Temperatur des Wasserbades und des Versuchskolbens schon vollzogen. Bei niederen Versuchstemperaturen (0 und 10°) stiegen diese beim Einführen des Blattpulvers zunächst um 2 bis 5°; es dauerte 2 bis 5 Minuten, bis der Ausgleich der beiden Temperaturen stattgefunden hatte. Bei diesen Versuchen habe ich die Kolben nicht durchlüftet, um bei allen Temperaturen in bezug auf Wegführung von Ammoniak, Kohlendioxyd und Wasserdampf möglichst konstante Bedingungen zu haben. Die Versuche dauerten 2 Stunden. Vergl. Fig. 1.

Tabelle X.

Temp. °C	Temp. im Wasserbad °C	Temp. im Kolben °C	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4'' Abnahme g	Abnahme %
29	Kontrolle	—	0,1887	0,1886	—	—
0	Eis 0	0	0,1887	0,1848	0,0039	2,07
10	10	10	0,1887	0,1707	0,0180	9,5
20	20	20	0,1887	0,1571	0,0316	16,7
30	30	30	0,1887	0,1386	0,0501	26,5
40	40,5	40	0,1887	0,1518	0,0369	19,6
50	50,5	50	0,1887	0,1738	0,0149	7,9
60	60,5 [1])	60	0,1887	0,1769	0,0118	6,2
70	71,0	70	0,1887	0,1826	0,0061	3,2

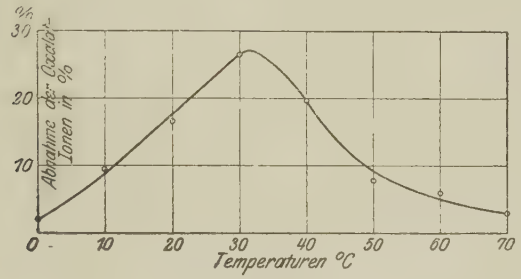

Fig. 1.

Der Tabelle X und der Kurve (Fig. 1) ist zu entnehmen, daß bei 0° eine Verarbeitung stattfindet; diese kann einerseits durch das beim Einbringen des Blattpulvers erfolgte Ansteigen der Temperatur um 5° bedingt sein, andererseits durch den 5 Minuten langen Ausgleich der Temperatur. Von 0° steigt die Verarbeitung mit der Temperatur bis über 30°, um gegen 40 und 50° stark abzufallen. Auch bei 60 und 70° findet noch Verarbeitung statt. Diese kann durch die Gegenwart der Oxalationen ermöglicht worden sein, die, wie wir sahen (S. 32), das Enzym wahrscheinlich schützen.

Das Optimum der Oxalatverarbeitung liegt somit bei Rumex zwischen 30 und 40°. Da die Enzyme Katalysatoren sind, so ist zu erwarten, daß einer Steigerung der Temperatur eine Steigerung der Enzymtätigkeit parallel geht. Die Proportionalität zwischen Temperaturerhöhung und Verarbeitung des

[1]) Bei höheren Temperaturen mußte die Wasserbadtemperatur etwas höher gehalten werden, um im Versuchskolben Konstanz zu haben.

Oxalats besteht aber nur bis zu einer bestimmten Grenze. Wird die Temperatur über diese hinaus gesteigert, so nimmt die Verarbeitung ab.

Dies ist durch zwei Prozesse bedingt: Die Temperatursteigerung führt zu einer Beschleunigung der Verarbeitung, jedoch auch zum Zerfall des Enzyms (Tammann 1895); dieser ist bei niederen Temperaturen sehr gering, wird aber bei steigender Temperatur stark beschleunigt. Solange die Beschleunigung der Enzymtätigkeit vorherrscht, nimmt die Verarbeitung des Oxalats zu; wenn aber der Enzymzerfall die Enzymwirkung überwiegt, beginnt die Verarbeitung abzunehmen. Das Resultat der Superposition dieser beiden Vorgänge ist das Optimum.

Außer der längeren Einwirkung der höheren Temperatur selbst führt eventuell auch die durch die erhöhte Temperatur bewirkte stärkere Dissoziation der Produkte der Enzymwirkung (Kohlendioxyd, Ammoniak usw.), die in diesen Versuchen nicht weggeführt werden konnten, zur Abnahme der Verarbeitung.

Der Temperaturkoeffizient.

Für chemische Reaktionen wurde festgestellt, daß bei einer Temperatursteigerung um 10^0 die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt oder gar verdreifacht wird. Diese Gesetzmäßigkeit ist von Kanitz (1915) als Reaktionsgeschwindigkeit-Temperaturregel oder R.-G.-T.-Regel bezeichnet worden; sie ist auch unter dem Namen van t'Hoffsche Regel bekannt.

Um diese R.-G.-T.-Regel in unserem Versuch mit Rumex zu prüfen, müssen wir die Geschwindigkeitskonstanten K der verschiedenen Temperaturen berechnen. Die K-Werte werden nach der Gleichung (Höber 1914, und Bayliss 1910):

$$K = \frac{1}{t} \log \text{nat} \frac{a}{a - x}$$

ermittelt.

In dieser Gleichung bedeutet a die Anfangskonzentration des Oxalations, x die während der Zeit t (in unserem Versuche 2 Stunden) verarbeitete Oxalationenmenge. Wenn die K-Werte rechnerisch bekannt sind, erhält man den Quotienten (Q_{10}) durch Division der Geschwindigkeitskonstanten der um 10^0 höheren Temperatur ($K_t + 10$) durch die

Konstante der niederen Temqeratur (K_t). Man bezeichnet ihn als Temperaturkoeffizienten oder Temperaturquotienten (Q_{10}).

$$Q_{10} = \frac{K_t + 10}{K_t}$$

(s. Kanitz 1915, S. 9).

Temp. °C	a g	x g	$K = \frac{1}{t} \log \text{nat} \frac{a}{a-x}$	°C	Q_{10}
0	0,1887	0,0039	0,01048	0—10	4,78
10	0,1887	0,0180	0,05013	10—20	1,83
20	0,1887	0,0316	0,09172	20—30	1,688
30	0,1887	0,0501	0,15429	30—40	0,7053
40	0,1887	0,0369	0,10881	40—50	0,378
50	0,1887	0,0149	0,04113	50—60	0,792
60	0,1887	0,0119	0,03257	60—70	0,504
70	0,1887	0,0061	0,01643		

Die Geschwindigkeitskonstanten K steigen bis 30° an, um nachher wieder stark abzufallen. Der Temperaturkoeffizient ist nirgends konstant, sondern sehr variabel. Er erreicht nirgends den theoretischen Wert von 2 oder 3. Dieser Unterschied zwischen theoretischen und wirklich erhaltenen Werten kommt auch bei anderen enzymatischen Prozessen vor. Slator (1906), der bei der alkoholischen Gärung den Temperaturquotienten für kleinere Zeitintervalle bestimmte, fand ebenfalls sehr stark schwankende Werte (7,0; 4,5; 3,3; 2,5 usw.).

Diese Abweichungen vom theoretischen Wert können bei enzymatischen Prozessen durch die Heterogenität des Mediums bedingt sein.

b) Einfluß des Sauerstoffs auf die Verarbeitung.

Aus den Untersuchungen von Mayer (1878), Kraus (1886b), de Vries (1885), Gerber (1896) und Warburg (1886) geht hervor, daß die Lichtentsäuerung der Succulenten an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden ist. Auch Bassalik (1917) fand, daß bei Rumex die Verarbeitung des Oxalations von der Sauerstoffzufuhr abhängt. Zur Feststellung der Abhängigkeit der Oxalatverarbeitung von der Sauerstoffzufuhr leitete ich durch die Versuchskolben innerhalb der Versuchsdauer (2 Stunden) verschiedene Luftmengen und bestimmte nachher die Verarbeitung des Oxalations; Temperatur 37°.

Tabelle XI.

Versuch	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4'' Abnahme g	Abnahme %	Luftmenge pro Kolben und Stunde
7	0,5000	0,4453	0,0547	10,9	200 ccm
8	0,5000	0,4140	0,0860	17,2	1 Liter
9	0,5000	0,3920	0,1080	21,6	2 „
10	0,5000	0,3735	0,1265	25,3	10 „
4[1])	0,5000	0,3727	0,1273	25,5	10 „
11	0,5000	0,3964	0,1036	20,7	20 „
12	0,5000	0,3973	0,1027	20,5	50 „

Diese Versuchsserie (s. Tabelle XI) zeigt deutlich, daß, je mehr Luft durch den Versuchskolben gesogen, desto mehr Oxalat verarbeitet wird. Allerdings darf man die Durchlüftung nicht allzusehr steigern (wie Versuche 11 und 12 zeigen), denn mit immer wachsender Durchlüftung beginnt die Verarbeitung wieder abzunehmen. Diese Erscheinung kann dadurch bedingt sein, daß von der großen Menge Luft, die durch den Versuchskolben gesogen wird, der im Kolben befindliche Wasserdampf stets fortgeführt und außerdem solcher stets von neuem gebildet wird, was eine Steigerung der Konzentration zur Folge hat. Ferner bildet sich bei der starken Durchlüftung im Versuchskolben Schaum, in den ein Teil des Enzyms konzentriert und zugleich inaktiviert wird; diese Erscheinung bezeichnet man als Schüttelinaktivierung (C. Oppenheimer 1910).

Im Hinblick auf die Tatsache, daß die Verarbeitung von einer mäßig gesteigerten Sauerstoffzufuhr begünstigt wird, habe ich die Enzymtätigkeit auch in einer Wasserstoffatmosphäre untersucht.

Zu den Versuchen wurden Wulffsche Flaschen benutzt. In die drei Öffnungen einer solchen Flasche wurde ein Zuleitungsrohr, ein Ableitungsrohr und ein Trichter eingefügt; die Öffnungen wurden mit Kautschukpfropfen verschlossen. In die Kolben wurde vor dem Versuch je 1,0 g getrocknetes Rumexblattpulver und 0,1390 g Ammoniumoxalat gebracht. Darauf wurden die Kolben im Vakuum leergepumpt und dann aus einem Gasometer mit Wasserstoff gefüllt, welcher eine 5%ige alkalische Pyrogallollösung passierte, die ihn der letzten Spuren von Sauerstoff entledigte. Diese ganze Vorbehandlung wurde nach einer Stunde wiederholt; erst dann wurde der Versuch begonnen.

Darauf setzte ich durch den Trichter dem Blattpulver 10 ccm destilliertes Wasser zu, das ich folgendermaßen vorbehandelt hatte.

[1]) Dieser Versuch ist der Tabelle XIII entnommen.

Nachdem es in einem Kolben zum Sieden erhitzt und wieder erkaltet war, wurde Wasserstoffgas unter Druck hineingeleitet, das die gleiche Pyrogallollösung passiert hatte. Das Auskochen und Einleiten von Wasserstoffgas wurde zweimal durchgeführt. Die Wulffschen Flaschen kamen dann ins Wasserbad. Nach dem Versuch wurden die Enzyme durch 10 ccm ausgekochte Essigsäure abgetötet. Zur gleichen Zeit wurde ein gewöhnlicher Versuch mit einer Durchlüftung von 10 l pro Stunde als Kontrolle ausgeführt; Temperatur 38°.

Tabelle XII.

Versuch	Gas	C_2O_4'' im Material g	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4'' Abnahme g	Abnahme %
191	H_2	0,0102	0,1000	0,1074	0,0028	2,5
192	H_2	0,0102	0,1000	0,1065	0,0037	3,3
193	O_2	0,0102	0,1000	0,0708	0,0394	35,7

Der Versuch dauerte 3 Stunden.

In der Wasserstoffatmosphäre findet nur eine minimale Verarbeitung statt. Daß eine solche nicht völlig ausblieb, kann dadurch bedingt sein, daß nicht aller Sauerstoff entfernt werden konnte. Bei dem durchlüfteten Kontrollversuch erfolgte eine prompte Verarbeitung. Die enzymatische Verarbeitung des Oxalations ist also an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden. Das Enzym ist demnach eine Oxydase, die nach der Definition von Bach (1910) aus Oxygenase und Peroxydase besteht. Daß es sich um eine Oxydase handelt, geht auch daraus hervor, daß in allen Versuchen die Verarbeitung ohne Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd (Peroxyd) vonstatten geht.

c) Einfluß der Konzentration der Oxalationen auf ihre Verarbeitung.

Bei den nichtenzymatischen katalytischen Prozessen ist die Verarbeitung von der Konzentration des Substrats unabhängig, da die Verarbeitung durch das Massenwirkungsgesetz beherrscht ist. Bei enzymatischen Prozessen ist diese Unabhängigkeit von Konzentration und Verarbeitung nur dann vorhanden, wenn im Verhältnis zur Menge des Substrats[1]) die

[1]) Als Substrat wird im folgenden der Stoff bezeichnet, der vom Enzym verarbeitet wird.

Menge des Enzyms groß ist. Wächst aber die Menge des Substrats im Verhältnis zu derjenigen des Enzyms stark, so wird die Geschwindigkeit der Verarbeitung verringert.

Der Versuch über den Einfluß der Konzentration der Oxalationen auf ihre Verarbeitung wurde in der Art durchgeführt, daß zu je 1 g Rumexblattpulver verschiedene Konzentrationen des Oxalats zugesetzt wurden. Um die schädigende Wirkung der Abbauprodukte — in erster Linie Kohlendioxyd und Ammoniak — möglichst auszuschalten, wurde die Durchlüftung mit steigendem Oxalatgehalt gesteigert (vergl. S. 36). Der Versuch dauerte jeweilen 2 Stunden; Temperatur 37°.

Tabelle XIII.

C_2O_4'' in 50 ccm H_2O g	Konz. in 100 ccm H_2O g	C_2O_4'' gefunden nach d. Vers. g	C_2O_4'' Abnahme nach 2 Std. g	Abnahme %	Luftmenge per Kolben und Stunde
0,0100	0,02	0,0022	0,0078	78,0	200 ccm
0,0500	0,1	0,0319	0,0181	36,2	1 Liter
0,1000	0,2	0,0638	0,0362	36,2	2 „
0,5000	1,0	0,3727	0,1273	25,5	10 „
1,0000	2,0	0,7625	0,2375	23,7	20 „
2,500	5,0	0,2259	0,2741	10,9	50 „

Aus den Versuchen geht hervor, daß die Verarbeitung des Oxalats seiner Konzentration im allgemeinen nicht parallel geht. Wächst die Konzentration von 0,02 auf 0,1%, so werden nicht 5 mal so viel Oxalationen verarbeitet, wie theoretisch zu erwarten wäre, sondern nur doppelt so viele. Bei Verdoppelung der Konzentration von 0,1 auf 0,2% wird jedoch auch die Verarbeitung verdoppelt. Werden die Oxalationen von der Konzentration 0,2 auf 1,0% vermehrt, so wächst die Verarbeitung nur um das 3,5- statt 5 fache.

Ferner berechtigen die Werte der prozentualen Verarbeitung zu dem Schluß, daß, je niedriger die Konzentration, um so größer der relative Umsatz ist und umgekehrt. Die Verarbeitung ist der Konzentration der Oxalationen nur dann annähernd proportional, wenn diese zur Enzymmenge in einem gewissen Verhältnis steht (vgl. Konzentration 0,1 und 0,2). Bei höheren Konzentrationen wächst die Verarbeitung nicht mehr proportional, sondern langsamer. Dies beeinflußt selbstverständlich die Geschwindigkeitskonstanten K; diese sind in folgender Tabelle zusammengestellt. Sie wurden berechnet nach der

Gleichung: $\log c_1 - \log c_2 = 0{,}4343 \cdot K \cdot t$ (vgl. Gleichung S. 34 in vereinfachter Form).

Konzentration:	0,02	0,1	0,2	1,0	2,0	2,5
$K = 10^3$	757	224	224	147	136	58
$K \cdot a$	15,14	22,4	44,8	147	272	145

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß mit wachsenden Konzentrationen die Werte der Geschwindigkeitskonstanten abfallen. Diese K-Werte sind also abhängig von der Anfangskonzentration. Je niedriger diese ist, um so größer der K-Wert; je höher die Konzentration steigt, um so mehr fallen die Geschwindigkeitskonstanten ab.

Das Produkt aus Anfangskonzentration a und der Geschwindigkeitskonstante K zeigt keine Konstanz, sondern steigt allmählich an, erreicht ein Maximum und fällt dann ab.

d) Einfluß der Enzymmenge auf die Oxalatverarbeitung.

Die folgenden Versuche sollen den Einfluß der Menge des Enzyms auf die Verarbeitung des Substrats klarstellen. Während bei den im letzten Abschnitt besprochenen Versuchen die Menge des Enzyms stets gleich groß war und die Menge des Oxalats verändert wurde, gab ich in den folgenden Versuchen dieselbe Menge Oxalat zu verschiedenen Mengen des Enzyms. Der Versuch dauerte 4 Stunden, Temperatur 38°.

Rumexblattpulver.

Tabelle XIV.

Angewandte Enzymmenge g	Konzentration d. Enzymmenge	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4''-Abnahme g	Abnahme %
0,05	1	0,1527	0,1408	0,0119	7,8
0,10	2	0,1527	0,1355	0,0172	11,2
0,50	10	0,1527	0,1131	0,0396	25,9
1,00	20	0,1527	0,0999	0,0528	34,5

Wir sehen aus dieser Versuchsserie, daß mit steigender Enzymmenge auch die Verarbeitung steigt. Es erhebt sich

nun die Frage, ob die Menge des verarbeiteten Oxalats der Menge des Enzyms proportional ist, ob also bei Verdoppelung der Enzymmenge auch die Verarbeitung verdoppelt wird. Dies ist jedoch nicht der Fall. Tabelle XIV zeigt, daß die Verarbeitung des Oxalats bedeutend langsamer ansteigt als die Zunahme der Enzymmenge. Eine solche Abweichung von der Proportionalität ist bei enzymatischen Prozessen schon öfters gefunden worden und wurde von Schütz (1885) folgendermaßen formuliert: „Der Umsatz (Verarbeitung) ist proportional der Quadratwurzel der Enzymmenge."

Diese Schützsche Regel wird durch die Gleichung $U = x\sqrt[2]{F}$ ausgedrückt, wobei U den Umsatz (Verarbeitung), F die Enzymmenge und x die Menge des Oxalats bedeutet, die durch die Konzentration 1 des Enzyms verarbeitet wird. Dies ist eine Konstante, die in diesem Beispiel den Wert von 0,0119 hat (vgl. Tabelle XV, S. 40).

In folgender Tabelle sind die gefundenen und die berechneten Werte zusammengestellt.

Tabelle XV.

Konzentration	Experimentell gef. Werte		Theoretische Werte		Gef. K-Werte, berechn. nach $\log c_1 - \log c_2 = 0{,}4343\, K \cdot t$	Theoret. Werte von K
	C_2O_4''-Abnahme	Abnahme %	C_2O_4''-Abnahme	Abnahme %		
1	0,0119	7,8	0,0119	7,8	0,0202	0,0202
2	0,0172	11,2	0,0168	11,0	0,0298	0,0285
10	0,0396	25,9	0,0376	24,6	0,0750	0,0638
20	0,0528	34,5	0,0532	34,9	0,1060	0,0903

Die berechneten und experimentell gefundenen Werte zeigen eine gute Übereinstimmung. Die Verarbeitung des Oxalations erfolgt also bei konstanter Menge der Oxalationen, aber variabler Enzymmenge unter den obwaltenden Versuchsbedingungen gemäß der Schützschen Regel. Des ferneren zeigt die Tabelle, daß mit zunehmender Enzymmenge auch die Geschwindigkeitskonstanten K wachsen, aber auch nicht proportional der Menge des Enzyms, sondern annähernd proportional der Quadratwurzel aus derselben. Dies verlangt auch die Schützsche Regel. Die gefundenen und theoretischen Werte weichen allerdings voneinander ab, was auch im folgenden zum Ausdruck kommt.

Relative Enzymmenge:	1	2	10	20
Geschw.-Konstanten $K = 10^4$	202	298	750	1060
$\frac{K}{\sqrt{F}}$	202	211	237	237

Der Quotient aus Geschwindigkeitskonstanten und Quadratwurzel aus der Enzymmenge sollte eine Konstante sein; tatsächlich nimmt er mit steigender Enzymmenge zu.

Helianthus-Enzympräparat.

Zu den Versuchen wurde das Enzympulver des Blattpreßsaftes von Helianthus annuus verwendet; Temperatur 38°. Versuchsdauer 4 Stunden.

Tabelle XVI.

Enzymmenge g	Relative Konzentration des Enzyms	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4''-Abnahme g	Abnahme %
0,01	1	0,1527	0,1500	0,0027	1,7
0,02	2	0,1527	0,1483	0,0044	2,8
0,10	10	0,1527	0,1426	0,0101	6,6
0,20	20	0,1527	0,1386	0,0141	9,2

Aus diesen Versuchen kann von neuem gefolgert werden, daß die Verarbeitung mit der Quadratwurzel aus der Enzymmenge wächst.

Die berechneten Werte sind in folgendem zusammengestellt.

Konzentration des Enzyms	Experimentell gefundene Werte		Theoretisch berechnete Werte		$\log c_1 - \log c_2 = 0{,}4343 \cdot K \cdot t$	
	C_2O_4''-Abnahme	Abnahme %	C_2O_4''-Abnahme	Abnahme %	K gefunden	K berechnet
1	0,0027	1,7	0,0027	1,7	0,00440	0,0044
2	0,0044	2,8	0,0038	2,4	0,00709	0,0062
10	0,0101	6,6	0,0085	5,4	0,01710	0,0139
20	0,0141	9,2	0,0121	7,6	0,02420	0,0197

Die gefundenen Werte weichen von den berechneten stärker ab als bei dem Versuch mit Rumexblattpulver; dies kann da-

durch bedingt sein, daß die erste gefundene Zahl 0,0027, auf der sich die weiteren Berechnungen aufbauen, etwas zu klein ist.

Die Ursache der Abweichung von der Proportionalität bei einer Steigerung der Enzymkonzentration kann einerseits durch die Abbauprodukte, andererseits durch die Änderung der Konzentration der Wasserstoffionen bedingt sein.

e) Der Verlauf der Oxalatverarbeitung.

Die Verarbeitung der Oxalationen muß auch als enzymatischer Vorgang den Gesetzen der Kinetik unterworfen sein. Wie verhalten sich nun diesen gegenüber die Blattpulver des säurehaltigen Rumex und des säurefreien Helianthus?

Das die chemischen Umsetzungen beherrschende, für Physiologie und Chemie gleich wichtige Gesetz der chemischen Massenwirkung von Guldberg und Waage besagt, daß die Geschwindigkeit jeder Reaktion der Konzentration der reagierenden Stoffe proportional ist. Diese Gesetzmäßigkeit kann durch dieselbe Gleichung: $K = \frac{1}{t} \cdot \log \text{nat} \cdot \frac{a}{a - x}$ ausgedrückt werden, welche auch für die monomolekulare Reaktion gilt. In dieser Gleichung bedeutet K die Geschwindigkeitskonstante, a die Anfangskonzentration und x die während des Zeitintervalles t verarbeitete Oxalatmenge.

Die Hydrolyse des Rohrzuckers durch eine Säure ist z. B. eine solche monomolekulare Reaktion, bei der die Gültigkeit dieses Gesetzes zahlenmäßig nachgewiesen werden konnte[1]).

Die Versuche mit Rumex und Helianthus führte ich in folgender Weise durch.

In einen 1 l fassenden Kolben mit Helmaufsatz wurden 400 ccm einer ca. $^1/_2$ %igen Ammoniumoxalatlösung und 16 g Blattpulver gebracht. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden mittels einer Pipette aus dem Versuchskolben 50 ccm der Lösung, somit der Blattpulvermenge wie auch der Oxalatlösung, ein aliquoter Teil entnommen und der Analyse unterworfen, um das noch unverarbeitete Oxalat zu bestimmen.

---

[1]) Euler, 1908, S. 41.

Versuche mit Rumex-Blattpulver.

Aus der Tabelle XVII wie auch aus Fig. 2 läßt sich ersehen, daß die Verarbeitung von der 0. bis zur 90. Minute stetig ansteigt. Nach der 90. Minute geht die Verarbeitung nur noch allmählich vorwärts; die Kurve verläuft darum fast parallel der Abszissenachse. Ich habe in Fig. 2 auch die theoretische Kurve eingetragen. Diese würde man erhalten, wenn die Reaktion einzig und allein dem Massenwirkungsgesetze folgte und wenn keine störenden Nebeneinflüsse wirksam wären. Die tatsächlich erhaltene Kurve liegt unter der theoretischen; die beiden decken sich also nicht. Von letzterer weicht die tatsächlich erhaltene Kurve besonders stark zwischen der 90. und 150. Minute ab. Die Geschwindigkeitskonstanten, die nach der Gleichung für die monomolekularen Reaktionen berechnet wurden, zeigen mit Ausnahme des ersten und letzten Wertes eine gute Konstanz. Der erste Wert liegt vielleicht darum zu hoch, weil während der Zeit des Einbringens des Blattpulvers, des Umschüttelns und der Probeentnahme schon eine minimale Verarbeitung stattgefunden haben kann. Der letzte K-Wert fällt offenbar infolge einer Verlangsamung der Verarbeitung stark ab. Diese kann zunächst durch die Abbauprodukte (Kohlendioxyd, Ammoniak usw.) bedingt sein, die trotz gleichmäßiger Durchlüftung vielleicht nicht in genügendem Maße fortgeführt wurden. Dann kann aber auch die Verarbeitung durch die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration verzögert worden sein. Diese wurde bei jeder Probeentnahme mit Lakmuspapier geprüft. Dabei konnte in der zuerst sauren Lösung nach der 5. Probe nur noch eine schwach saure Reaktion festgestellt werden; in der 6. Probe trat schon eine schwach alkalische Reaktion auf, die bis zur 7. und letzten Entnahme sich noch merklich verstärkte. Diese kann wohl die Ursache der gegen Ende des Versuches deutlichen Verminderung der Oxalatverarbeitung sein. Schon Bassalik (1917) hat gezeigt, daß die Verarbeitung des Oxalations bei Rumex im alkalischen Medium sehr träge verläuft. Die Verarbeitung des Oxalations durch das Enzym von Rumex erfolgt während der ersten Zeitintervalle nach der monomolekularen Gleichung, später weicht sie stark von ihr ab.

Tabelle XVII.

Versuch	Temperatur °C	Blattmenge g	Zeiten	Luft pro Zeitintervall l	C_2O_4'' in 50 ccm Probeentnahme	C_2O_4'' gef. nach Zeitintervall in 50 ccm g	Abnahme %	Reaktion der Probe	$\log \frac{a}{a-x}$	K	K''	Theoretische Abnahme %
						Rumex.						
1	30	1,06	sofort	—	0,1707	—	—	sauer	—	—	—	—
2	30	1,08	15′	1,2	—	0,1548	9,3	„	0,09777	0,00651	—	10,0
3	30	1,03	30′	1,5	—	0,1460	14,5	„	0,15629	0,00521	—	19,0
4	31	0,97	45′	1,5	—	0,1338	21,6	„	0,24356	0,00541	—	27,0
5	30,5	1,00	60′	1,8	—	0,1258	26,3	schw. sauer	0,30521	0,00509	—	35,0
6	30	0,82	90′	3,7	—	0,1047	38,7	schw. alkal.	0,48881	0,00543	—	48,0
7	30,5	1,04	150′	7,6	—	0,0990	42,0	alkalisch	0,54478	0,00363	—	66,0
						Helianthus.						
1	31	—	sofort	—	0,1404	—	—	sauer	—	—	—	—
2	31	—	15′	2,5	—	0,0871	37,9	„	0,47744	0,0318	0,0266	38,0
3	31	—	30′	2,5	—	0,0558	60,2	„	0,92275	0,0307	0,0235	61,0
4	$30^1/_2$	—	45′	$2^3/_4$	—	[0,0309[1])]	(78,0)	„	(1,51378)	(0,0336)	(0,0236)	76,0
5	30	—	60′	3	—	0,0081	94,2	schw. sauer	2,85328	0,0475	0,0293	85,0
6	31	—	90′	5,5	—	0,0000	100,0	alkalisch	—	—	—	90,0

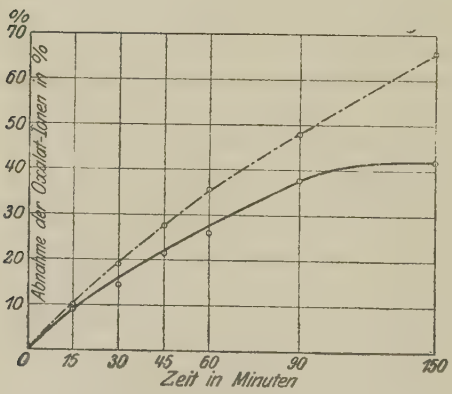

Fig. 2.

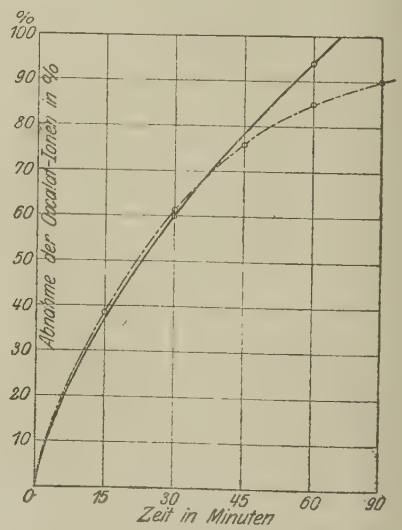

Fig. 3.

[1]) Diese Analyse mißlang. Die Werte sind durch Interpolation berechnet.

Versuche mit Helianthus-Blattpulver.

Die Versuche wurden mit Helianthus tuberosus durchgeführt. Da die Analyse der Probe, die nach der 45. Minute entnommen wurde, mißlang, wurden die in der Tabelle XVII angeführten Werte durch Interpolation berechnet. Den übrigen Zahlen der Tabelle ist zu entnehmen, daß die Verarbeitung rascher verläuft als bei Rumex; denn nach der 6. Probe konnte kein Oxalat mehr gefunden werden. Vergleichen wir an Hand der Fig. 3 den tatsächlichen Verlauf des Prozesses mit der theoretischen Kurve, so finden wir zu Beginn eine gute Übereinstimmung, während später die gefundenen Werte über die theoretisch berechneten ansteigen. Die Verarbeitung erfolgt also bedeutend rascher als nach der logarithmischen Kurve.

Die nach der monomolekularen Gleichung berechneten Werte der Geschwindigkeitskonstanten bleiben nicht konstant, sondern steigen mit zunehmender Versuchsdauer an. Auch hier muß der für die erste Entnahme gefundene Wert der Konstanten als zu hoch angesehen werden, aus Gründen, die ich auf S. 43 angegeben habe. Da die nach der monomolekularen Gleichung berechneten Werte der Geschwindigkeitskonstanten ansteigen, also nicht konstant sind, ergibt sich der Schluß, daß die Verarbeitung des Oxalations bei Helianthus der monomolekularen Gleichung nicht folgt.

Solche Abweichungen von der Gleichung hat auch Henri (1903) bei seinen Untersuchungen über die Hydrolyse des Rohrzuckers mittels Invertase gefunden; er nimmt an, daß während der Reaktion Stoffe entstehen, die den Prozeß autokatalytisch beschleunigen.

Für solche autokatalytische Umsetzungen stellt Henri (1901) folgende Gleichung auf:

$$K'' = \frac{1}{2t} \log \text{nat} \frac{a + x}{a - x}.$$

In dieser Gleichung bedeutet K'' eine Konstante, t das Zeitintervall, a die Anfangskonzentration und x die während der Zeit t verarbeitete Oxalatmenge. Aus der letzten Kolonne der Tabelle XVII ergibt sich, daß die K''-Werte im Gegensatz zu den K-Werten konstant sind. Die Verarbeitung des Oxalations verläuft somit bei Helianthus nach der Gleichung der

Autokatalyse. Dies nötigt zu der Annahme, daß die während des Prozesses entstehenden Abbauprodukte einen im Blattpulver enthaltenen Stoff aktivieren, der seinerseits die enzymatische Tätigkeit beschleunigt. Auf diesen katalytischen Vorgang ist auch die raschere Verarbeitung des Oxalations bei Helianthus als bei Rumex zurückzuführen.

f) Produkte der Verarbeitung.

Auf S. 35 wurde gezeigt, daß der enzymatische Abbau des Oxalations durch eine Oxydase bewirkt wird. Es soll nun noch an zwei Beispielen nachgewiesen werden, daß dabei Kohlendioxyd entsteht. Die Versuchsanordnung war die übliche, nur wurde zwischen Versuchskolben und Aspirator eine Pettenkofersche Röhre eingeschaltet, die mit titrierter Barytlauge beschickt war. Nach dem Versuch wurde die noch unzersetzte Oxalatmenge bestimmt und die nichtgebundene Lauge gegen $^n/_{10}$-Salzsäure zurücktitriert; als Indicator wurde Phenolphtalein benutzt.

Zur gleichen Zeit wurde ein Kontrollversuch mit einer abgewogenen Menge des Präparates in Wasser ohne Zusatz von Oxalat ausgeführt.

Tabelle XVIII.

Versuchs-Nr.	Pflanze	Enzym g	Temperatur °C	C_2O_4''-Abnahme in 24 Std. g	$^n/_{10}$-$Ba(OH)_2$ i. d. Pettenkoferschen Röhre ccm	$^n/_{10}$-HCl-Verbrauch ccm	CO_2 mg
5	Ungekeimtes Pisum sativum	5,0	35	0,0300	225,4	150,0	165,9
4	Ungekeimtes Pisum sativum in Wasser	5,0	35	—	244,0	178,0	145,2
140	Helianthus Enzympulver	0,3593	37	0,0744	104,8	86,8	39,6
141	Helianthus Enzympulver in Wasser	0,3500	37	—	107,2	101,7	11,1

Bei der Verarbeitung des Oxalations entsteht somit Kohlendioxyd. Jedoch kann zwischen der Oxalatabnahme und dem ausgeschiedenen Kohlendioxyd keine Relation festgestellt werden.

Auffallenderweise entsteht nun bei Pisum sativum mehr Kohlendioxyd als der abgebauten Oxalatmenge entspricht. Dieser Kohlendioxydüberschuß rührt offenbar von anderen im Samen erfolgenden enzymatischen Prozessen her. Daß beim Versuch mit Enzympulver von Helianthus weniger Kohlendioxyd ausgeschieden wurde als dem verarbeiteten Oxalat entspricht, zeigt, daß, wie schon Bassalik fand, neben Kohlendioxyd noch andere Abbauprodukte entstehen; nach diesen wurde aber nicht gesucht. Während Zaleski und Reinhard (1911) den enzymatischen Prozeß der Oxalatverarbeitung beim Weizenmehl nur auf Grund des ausgeschiedenen Kohlendioxyds festzustellen versucht haben, zeigen meine Versuche, daß man aus der Menge dieses Abbauproduktes allein kein richtiges Bild von der Menge des verarbeiteten Oxalations erhält. Nur eine quantitative Bestimmung der Abnahme des Oxalations selbst ermöglicht einen Einblick in die tatsächlichen Verhältnisse.

Da beim Abbau der Oxalsäure Kohlendioxyd gebildet wird, liegt die Vermutung nahe, daß das oxalatverarbeitende Enzym eine Carboxylase sei. Eine solche findet sich nicht nur in der Hefe (Neuberg [1911]), sondern, wie Zaleski (1913) festgestellt hat, auch in Samenpflanzen, wo sie aus brenztraubensauren Salzen Kohlendioxyd abspaltet und den Rest des Moleküls in Acetaldehyd überführt.

III. Schlußbetrachtung.

Bisher war ein oxalatverarbeitendes Enzym erst bei säurehaltigen Rumex-, Oxalis- und Begoniaarten nachgewiesen worden. Meine Arbeit verfolgt den Zweck, festzustellen, ob ein solches Enzym im Pflanzenreich — abgesehen von den Succulenten — allgemein verbreitet und auch bei säurefreien Pflanzen vorhanden sei. Dabei zeigte sich, daß alle von mir untersuchten Pflanzen und Pflanzenteile, sowohl die chlorophyllhaltigen wie auch die chlorophyllosen Gewebe und Zellen, die von außen zugesetzten gelösten Oxalationen mittels eines enzymatischen Prozesses verarbeiten können. Diese allgemeine Verbreitung des oxalatverarbeitenden Enzyms ist für den Stoffwechsel des Pflanzenorganismus von großer Bedeutung.

Mögen nun im Pflanzenkörper die Oxalationen dem aufbauenden oder assimilatorischen Stoffwechsel ihre Entstehung verdanken[1]), oder als Produkte unvollständiger Verbrennung der Kohlenhydrate[2]), oder endlich als Nebenprodukte der Eiweißsynthese anzusehen sein[3]), so werden sie mit Hilfe des Enzyms stets wieder in den Stoffwechsel einbezogen. Aus der Verarbeitung des Oxalations erhält die Pflanze nutzbare Energie, vielleicht auch höhere Kohlenstoffverbindungen.

Die Ansicht von de Vries (S. 59), nach der die Bildung und das Verschwinden organischer Säuren ein kontinuierlich fortschreitender Prozeß ist, erhält dadurch eine Stütze. Es ist auffallend, daß das aus dem säurefreien Helianthus hergestellte Enzym das Oxalation viel rascher und vollständiger verarbeitet als das aus dem säurehaltigen Rumex gewonnene. Dies legt die Vermutung nahe, daß Oxalate auch in den säurefreien Pflanzen in reichlicher Menge gebildet, jedoch durch das Enzym alsbald wieder abgebaut werden.

Zusammenfassung.

1. Die Oxalationen werden in allen untersuchten Pflanzenorganen enzymatisch verarbeitet.

2. Nicht nur in den chlorophyllhaltigen Blättern, sondern auch in den Stengeln, Wurzeln, chlorophyllfreien Samen und etiolierten Organen konnte dieses Enzym festgestellt werden.

3. Ein aus den Helianthusblättern dargestellter Preßsaft, wie auch ein durch Alkohol gefälltes Pulver vermögen die zugesetzten Oxalationen zu verarbeiten.

4. Das Enzym wird in Wasser durch Siedehitze zerstört.

5. Das Temperaturoptimum der Verarbeitung liegt zwischen 30 und 40°.

6. Die Verarbeitung ist in hohem Maße von der Sauerstoffzufuhr abhängig; in einer Wasserstoffatmosphäre findet keine Verarbeitung statt.

7. Mit steigender Oxalatkonzentration wird der relative Umsatz kleiner.

---

[1]) Baur (1913), Steinmann (1917), Bassalik (1917).

[2]) Kraus (1886b), Mayer (1875), Pfeffer (1897), Warburg (1886), Wehmer (1891), Czapek (1917).

[3]) Palladin (1887), Schimper (1890), Meyer (1918).

8. Bei wachsender Enzymkonzentration steigt die Verarbeitung mit der Quadratwurzel der Enzymmenge (Schützsche Regel).

9. Die Verarbeitung erfolgt beim Rumexblattpulver nach der monomolekularen Gleichung, während beim Helianthusblattpulver die Verarbeitung dem Gesetz der Autokatalyse unterworfen ist.

10. Das Enzym ist eine Oxydase.

11. Die Oxalationen werden durch diese Oxydase nur teilweise zu Kohlendioxyd abgebaut (bei Pisum zweifelhaft); andere Abbauprodukte sind bis jetzt noch unbekannt. Es scheint, daß das Enzym carboxylaseartiger Natur sei.

Literaturverzeichnis.

Amar, M., Sur le rôle de l'oxalate de calcium dans la nutrition des végétaux, Compt. rend. **136**, I, II, 901, 1903.

Bach, A., Die langsame Verbrennung und die Oxydationsfermente. Fortschritte der Naturwissenschaft **1**, 85, 1910.

Bassalik, K., Über die Verarbeitung der Oxalsäure des Bacillus extorquens, Jahrb. f. wissensch. Bot. **53**, 235, 1913.

Derselbe, Über die Rolle der Oxalsäure bei den grünen Pflanzen. I. Die Zersetzung der Oxalsäure bei Rumex acetosa. Bulletin de l'Acad. des sciences de Cracovie S. B. **1917**, S. 203.

Baur, E., Die Genesis der Kohlenhydrate. Die Naturwissenschaften **1**, 474, 1913.

Bayliss, Die Wirkung der Fermente **1910**.

Benecke, W., Über Oxalsäurebildung in grünen Pflanzen. Bot. Ztg. **61**, 79, 1903.

Brown and Morris, A., Contribution to the chemistry and physiology of foliage leaves. Journ. of the chem. Soc. **1**, 604, 1893.

Buchner, Die Zymasegärung **1903**.

Czapek, F., Biochemie der Pflanzen **2**, 1905.

Derselbe, Die Kultur der Gegenwart: Physiologie und Ökologie **3**, 1917.

Euler, H., Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie **1908**, II. und III. Teil.

Gerber, C., Recherches sur la maturation des fruits charnus. Annales d. sciences nat., 8e série, Bot. **4**, 1, 1896.

Henri, V., Über das Gesetz der Wirkung des Invertins, Zeitschr. f. physikal. Chem. **39**, 194, 1901.

Derselbe, Lois générales de l'action des Diastases. Thèse, Paris **1903**, 1.

Höber, R., Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. **1914**, 4. Aufl.

Kanitz, A., Die Biochemie in Einzeldarstellungen; Temperatur und Lebensvorgänge. **1915**.

Kraus, G., Über die Wasserleitung in der Pflanze, IV. Die Acidität des Zellsaftes. Abhandl. d. Naturf. Gesellsch. zu Halle **16**, 143, 1886a.

Derselbe, Über den Stoffwechsel der Crassulaceen. ibidem, **16**, 395, 1886b.

Lange, P., Beiträge zur Kenntnis der Zellsaftacidität, Inaug.-Diss. Halle 1886.

Mayer, A., Über die Bedeutung der organischen Säuren in den Pflanzen. Landw. Vers.-Stat. **18**, 410, 1875.

Derselbe, Über die Sauerstoffausscheidung einiger Crassulaceen. Landw. Vers.-Stat. **31**, 277, 1878.

Meyer, Arth., Die Beziehung zwischen Eiweiß- und Säurebildung in Laubblättern. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **36**, 508, 1918.

Neuberg, C. u. L. Karczag. Carboxylase, ein neues Enzym der Hefe. Biochem. Zeitschr. **36**, 68, 1911.

Oppenheimer, C., Die Fermente und ihre Wirkungen, 3. Aufl. 1910.

Palladin, W., Die Bildung organischer Säuren in wachsenden Pflanzenteilen. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **5**, 325, 1887.

Derselbe, Eiweißgehalt der grünen nnd etiolierten Blätter. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **9**, 194, 1891.

Derselbe, Aschengehalt etiolierter Blätter. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **10**, 179, 1892.

Derselbe, Recherches sur la corrélation entre la respiration des plantes et les substances azotées actives. Revue gén. d. botanique **8**, 225, 1896.

Derselbe, Die Arbeit der Atmungsenzyme unter verschiedenen Verhältnissen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**, 407, 1906.

Derselbe, Pflanzenphysiologie **1911**.

Pfeffer, W., Pflanzenphysiologie **1**, 2. Aufl., 1897.

Rosenthaler, Eiweiß als Schutzmittel der Enzyme. Biochem. Zeitschr. **26**, 9, 1910.

Schimper, A. F. W., Zur Frage der Assimilation der Nährstoffe durch die grüne Pflanze. Flora **73**, 207, 1890.

Schütz, E., Eine Methode zur Bestimmung der relativen Fermentmengen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**, 577, 1885.

Slator, A., Studies in fermentation. The chemical dynamics of alcoholic fermentation by yeast. Journ. of chem. Soc. **89**, 136, 1906.

Spoehr, H., Photochemische Vorgänge bei der diurnalen Entsäuerung der Succulenten. Biochem. Zeitschr. **57**, 99, 1913.

Steinmann, Alf., Studien über die Acidität des Zellsaftes beim Rhabarber. Zeitschr. f. Bot. **9**, 1, 1917.

Stoklasa, Beitrag zur Ernährung der Zuckerrübe. Phys. Bedeutung des Kaliumions im Organismus der Zuckerrübe **1916**.

Tammann, G., Zur Wirkung ungeformter Fermente. Zeitschr. f. physikal. Chem. 18, 436, 1895.

de Vries, Über die Periodizität im Säuregehalt der Fettpflanzen. Verslagen en Mededeelingen der K. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam III. reeks I. deel, S. 58, 1885.

Warburg, O., Über die Bedeutung der organischen Säuren im Lebensprozeß der Pflanzen. Unters. a. d. Bot. Inst. Tübingen 2, 53, 1886.

Wehmer, C., Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. Bot. Zeitung **49**, 233, 1891.

Zaleski, W., Über die Verbreitung der Carboxylasen in Pflanzen. Ber. d. Deutsch. Botan. Ges. **31**, 349, 1913.

Zaleski und Reinhard, Über die fermentative Oxydation der Oxalsäure. Biochem. Zeitschr. **33**, 449, 1911.

Vita.

Am 8. März 1893 wurde ich, Markus Staehelin, in Basel geboren als Sohn des Johannes Ernst Staehelin, Pfarrers daselbst, und der Sibylle geborenen Merian. Nach Absolvierung der Primarschule trat ich 1903 in das untere Gymnasium zu Basel ein. Im Jahre 1907/08 verweilte ich in der französischen Schweiz (Prangins). Im Sommer 1908 trat ich in die Obere Realschule von Basel ein, woselbst ich am 1. Oktober 1912 das Reifezeugnis erhielt.

Vom Herbst 1912 bis Winter 1918/19 war ich an der Universität Basel immatrikuliert. Durch wiederholten Grenzbesetzungsdienst verlor ich im ganzen etwa drei Semester.

Während meiner Studienzeit hörte ich Vorlesungen und nahm an Übungen teil bei den Herren Professoren und Dozenten: Bally, Bassalik, Bernoulli, Buxtorf, Fichter, Hagenbach, Janicki, Rupe, Schüepp, Senn, Speiser, Steinmann, Zickendraht und Zschokke.

Im Sommer 1913 nahm ich an einem hydrobiologischen Kurs in Luzern teil unter Leitung der Herren: Bachmann, Steinmann und Zschokke.

Allen diesen Herren möchte ich hier bestens danken für die Förderung und die freundlichen Ratschläge, die ich von ihnen erhalten habe.